TRYPTISCHE PHOSPHOPEPTIDMUSTER DES RIBOSOMALEN PROTEINS S6 AUS HELA – UND MPC – 11 – ZELLEN NACH IN VIVO UND IN VITRO PHOSPHORYLIERUNG

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ROSEMARIE NACHTIGALL

aus Leonberg (Württ.)

Berlin 1985

Tryptische Phosphopeptidmuster des ribosomalen Proteins S6 aus HeLa- und MPC-11-Zellen nach in vivo und in vitro Phosphorylierung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rosemarie Nachtigall
aus Leonberg (Württ.)

Berlin 1985

1. Gutachter: Professor Dr. J. Kruppa
2. Gutachter: Professor Dr. E. R. Lochmann

Tag der letzten mündlichen
Prüfung: 23. Mai 1985

Herrn Prof. Dr. E.R. Lochmann danke ich für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten und zu fördern.

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Molekularbiologie des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Hamburg angefertigt. Mein Dank gilt dem Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. G. Koch für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die großzügige Übernahme der Sachkosten.
Herrn Prof. Dr. J. Kruppa bin ich für die ständige Betreuung der Arbeit, für wertvolle Diskussionsbeiträge und Anregungen sowie seine stete Gesprächsbereitschaft zu Dank verpflichtet.
Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, insbesondere Herrn A. Bauche, Frau C. Behn, Frau Chr. Garreis-Wabnitz, Frau D. Fischer, Herrn D. Geisthardt, Herrn L. Graeve, Herrn Dr. W. Goemann, Herrn Dr. D. Mack und Herrn M. Zauke für die gute Zusammenarbeit.
Mein besonderer Dank gilt auch Frau K. Schramm für die zuverlässige Betreuung meines Sohnes, ohne ihre Hilfe hätte ich meine Arbeit nicht beenden können.
Ich möchte mich bei Herrn Chr. J. Ahrenkiel sowie bei Frau J. Marston bedanken für die unermüdliche Bereitschaft meine Arbeit an einem Textverarbeitungsgerät zu erstellen.
Zum Schluß bedanke ich mich bei meinem Ehemann für seine moralische als auch tatkräftige Unterstützung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0033

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	Einleitung	1
2.	Ergebnisse	7
2.1.	Verteilung der Mono- und Polysomen von MPC-11- und HeLa-Zellen in Abhängigkeit von Tonizitätsänderungen im Medium	7
2.2.	Darstellung des S6-Phosphorylierungsgrades durch zweidimensionale Gelelektrophorese	10
2.2.1.	In vivo phosphorylierte ribosomale Proteine	11
2.2.2.	In vitro Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen durch endogene Proteinkinasen	13
2.2.3.	In vitro Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase	15
2.3.	S6 Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase	21
2.3.1.	Kinetik der S6 Phosphorylierung	21
2.3.2.	Inhibierung der S6 Phosphorylierung	23
2.4.	Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide durch DEAE-Trisacryl-Säulen	27
2.5.	Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide durch Isoelektrische Fokussierung	33
2.6.	Zweidimensionale Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide durch Dünnschichtelektrophorese und Dünnschichtchromatographie	42

2.7.	Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese	51
2.8.	Phosphoaminosäurebestimmung tryptischer Phosphopeptide	57
3.	Zusammenfassung	59
4.	Material und Methoden	63
4.1.	Material	63
4.2.	Methoden	65
4.2.1.	Anzucht von Zellkulturen	65
4.2.1.1.	^{32}P-Orthophosphat-Markierung von Zellen in vivo	65
4.2.1.2.	Hochsalzbehandlung der Zellen	67
4.2.2.	Gewinnung eines postnuklearen Überstandes aus Zellen	68
4.2.3.	Isolierung der Ribosomen	69
4.2.4.	Trennung von Poly- und Monosomen	69
4.2.5.	Dissoziation von Poly- und Monosomen in ribosomale Untereinheiten	70
4.2.6.	Gewinnung aktiver Ribosomen aus der Gesamtpopulation	73
4.2.7.	Isolierung von ribosomalen Proteinen	73
4.2.7.1.	Hochsalzbehandlung von Ribosomen	73
4.2.7.2.	RNA-Extraktion	74
4.2.7.3.	Acetonfällung ribosomaler Proteine	74
4.2.7.4.	Lyophylisation ribosomaler Proteine	75
4.2.8.	Proteinbestimmung	75

4.2.9. ^{32}P-ATP-Markierung von Ribosomen und ribosomalen Proteinen in vitro mit Proteinkinasen 76

4.2.10. Auftrennung ribosomaler Proteine durch Gelelektrophorese 78

4.2.10.1. Eindimensionale Gelelektrophorese 78

4.2.10.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese 81

4.2.11. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brillant Blau 85

4.2.12. Fluorographie von radioaktivem Protein in Polyacrylamidgelen 86

4.2.13. Messung radioaktiver Proben 86

4.2.14. Elution von S6 aus Polyacrylamidgelen 87

4.2.15. Spaltung von S6 in Polyacrylamidgelen mit Trypsin 87

4.2.16. Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide 88

4.2.16.1. DEAE-Trisacryl-Säule 88

4.2.16.2. Dünnschichtelektrophorese und Chromatographie 89

4.2.16.3. Isoelektrische Fokussierung 91

4.2.17. Elution von Phosphopeptiden aus Dünnschicht-Cellulose-Platten 93

4.2.18. Phosphoaminosäurebestimmung 93

5. Diskussion 95

6. Literaturverzeichnis 103

SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUG	A: Adenin, U: Uracil, G: Guanin (Startcodon bei der Proteinbiosynthese)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Met-tRNA	mit Methionin beladene tRNA (bei der Proteinbiosynthese)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
A	Ampere
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute

h	Stunde
IP	isoelektischer Punkt
min	Minute
mS	Millisiemens
OD_{λ}	optische Dichte (-Einheiten) bei der Wellenlänge λ :1 OD ist die Substanzmenge, die, in 1 ml Lösungsmittel gelöst, die Extinktion 1 aufweist, wenn die Schichtdicke der Küvette 1 cm beträgt.
S	Einheit der Sedimentationskonstante (Svedberg - Einheit)
U	Umdrehung
V	Volt
Vol	Volumen

1. E I N L E I T U N G

Die genetische Information für Proteine ist in der Desoxyribonukleinsäuresequenz von Genen gespeichert. Als Genexpression wird die "Abrufung" der in den Genen gespeicherten Information und ihre Umsetzung in die Synthese eines Proteins bezeichnet. Proteine sind an biologischen Stoffwechselprozessen in der Zelle wie z.B. Wirkungsweise von Enzymen, Differenzierung, Vererbung - aber auch pathologisches Geschehen wie Krebsentstehung - beteiligt.
Die Genexpression in eukaryontischen Zellen erfolgt in mehreren Teilschritten, die in verschiedenen Kompartimenten ablaufen.
1. Transkription: Im Zellkern findet die Übertragung der Information von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) auf die Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) statt.
2. Spleißen, Assoziation mit Proteinen und Transport der mRNA ins Cytoplasma.
3. Translation: Im Cytoplasma erfolgt die Übersetzung der in der Nukleinsäuresequenz einer mRNA enthaltenen Information in die Aminosäuresequenz eines Proteins. Die Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen statt, welche über den zur Peptidverknüpfung erforderlichen enzymatischen Apparat verfügen.
Die Regulation der Genexpression, das Ausmaß der Biosynthese von Proteinen kann auf der Ebene der Transkription und Translation stattfinden. Über die Regulationsmechanismen der Transkription (Enzyminduktion, Repression der Proteinbiosynthese durch Endprodukt der Synthesekette) ist mehr bekannt als über die der Translation. Die Translation besteht aus drei Schritten: Initiation, Elongation und Termi-

nation. Die Initiation ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt, dieser Schritt der Translation ist ein wichtiger Angriffspunkt für deren Regulation (1).

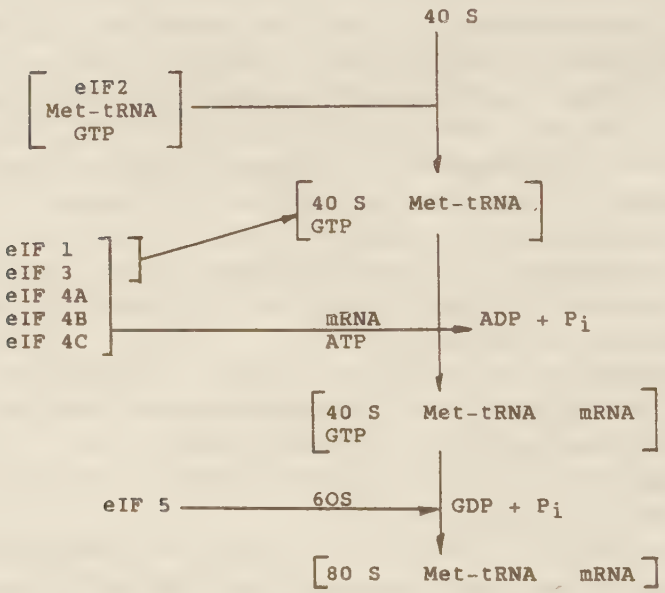


Abb. 1: Schematische Darstellung der Initiation der Translation
(nach Trachsel et al. (2)

40S, 60S: kleine bzw. große ribosomale Untereinheit

80S: Ribosom

Met-tRNA: mit Methionin beladene Initiator-tRNA

eIF: eukaryontischer Initiationsfaktor

P_i: anorganisches Phosphatmolekül

Die Initiation ist ein komplizierter, in zahlreichen Einzelschritten ablaufender Prozeß, bei dem mehrere Proteine als Initiationsfaktoren mitwirken. Zunächst wird der ternäre Komplex bestehend aus eIF 2, Met-tRNA und GTP gebildet, daran assoziiert sich die kleine ribosomale 40S-Untereinheit. Der Komplex aus der 40S-Untereinheit, Met-tRNA und GTP wird am 5'-Ende der mRNA gebunden und wandert nach einem Modell von Kozak (3) dann die mRNA entlang bis zum ersten (bis auf wenige Ausnahmen) AUG-Codon, dem Startcodon der Proteinsynthese, um dort mit der großen ribosomalen 60S-Untereinheit den fertigen Initiationskomplex zu bilden. Die Initiation kann durch Phosphorylierung von Initiationsfaktoren (4,5) oder ribosomalen Proteinen (6,7) als Antwort auf äußere Bedingungen - wie Änderungen der Salzkonzentration oder Aminosäuremangel - reguliert werden. Am besten bekannt ist die Phosphorylierung des eIF 2, die in vitro im Retikulozytensystem aus Kaninchen untersucht wurde. Wenn die Haeminkonzentration abnimmt, wird ein Haemin regulierter Inhibitor HRI aktiviert. HRI ist eine cAMP unabhängige Proteinkinase, die die α -Untereinheit von eIF 2 phosphoryliert: in diesem Zustand kann ein weiterer Inhibitor eIF 2 binden, so daß sich dieser nicht mehr am ternären Komplex beteiligen kann.

In wieweit die Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen an der Regulation der Proteinbiosynthese beteiligt ist, ist noch weitgehend unklar. Ribosomen von Säugetieren enthalten 70 bis 80 ribosomale Proteine, ungefähr 30 Proteine gehören zur kleinen ribosomalen Untereinheit und 45 bis 50 Proteine zur großen (8,9).

Das Proteinmuster eukaryontischer Ribosomen der unterschiedlichsten Zellarten (z.B. Hela-, MPC-11-, 3T3-Zellen und Retikulozyten) ist sehr ähnlich (10),

deswegen wurde eine einheitliche Nomenklatur für ribosomale Proteine festgesetzt (11). In normal wachsenden HeLa-Zellen wurden bisher drei ribosomale Phosphoproteine identifiziert, zwei saure Proteine, die an die große Untereinheit assoziieren und ein basisches Protein, das mit der kleinen Untereinheit fest verankert ist und als S6 bezeichnet wird.
Das Protein S6 (M=30 000 Dalton) kann an mehreren Stellen phosphoryliert werden (9,10,12). Gibt man zu einer Zellsuspension Substanzen wie Kälberserum, Insulin oder Epidermal Growth Factor (EGF) dazu (13) liegt S6 in seiner hochphosphorylierten Form vor (14,15,16); pro Molekül S6 werden vier (Tomatenzellen, Oozyten) bis fünf (HeLa-, 3T3- und MPC-11-Zellen) Phosphatmoleküle gebunden.
Durch Veränderung der Umweltbedingungen läßt sich in vivo eine Dephosphorylierung von S6 erreichen, bei Tomatenzellen durch Temperaturerhöhung (17) und bei MPC-11-Zellen durch Tonizitätsänderung (18,19).
Die funktionelle Bedeutung der S6 Phosphorylierung ist bisher nicht geklärt. Einigkeit herrscht bei den genannten Autoren über die positive Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsgrad von S6 und der Proteinbiosyntheserate in der ersten Zeit nach Behandlung der Zellen mit stimulierenden Substanzen.

Bei Seeigeleiern wurde eine enorme Steigerung der S6 Phosphorylierung und Zunahme der Proteinsyntheserate nach deren Befruchtung beobachtet (20), dies gilt auch für Oozyten, wenn diese mit Progesteron stimuliert worden sind (16).
Vieles deutet darauf hin, daß die S6 Phosphorylierung für eine gesteigerte Proteinsyntheserate wichtig ist (21,14,22). Die kleine ribosomale Untereinheit, die hochphosphoryliertes S6 enthält, bildet effektiver Initiationskomplexe und Polysomen als die 40S-Unter-

einheit, die niederphosphoryliertes S6 enthält (23, 24). Für das Anhalten der gesteigerten Proteinsynthese rate muß S6 nicht mehr als hochphosphoryliertes Protein vorliegen, (25), hochphosphoryliertes S6 ist für einen sehr frühen Schritt innerhalb des Initiationskomplexes mit verantwortlich und zwar für die Bindung der mRNA an die 40S-Untereinheit (26).
Wenig bekannt ist auch über die Enzyme, die für die Phosphorylierung von S6 verantwortlich sind. S6 wird in vitro im Retikulozytensystem an zwei Stellen durch die cAMP abhängige Proteinkinase phosphoryliert (27). Zu einem ähnlichen Resultat kamen Wettenhall und Cohen, sie stellten fest, daß S6 aus Leberribosomen in vitro durch die cAMP abhängige Proteinkinase an zwei Stellen, deren Aminosäuresequenz sie bestimmten, phosphoryliert wird (28). Da es sich um mehrere Phosphorylierungstellen handelt, wird angenommen, daß bei der S6 Phosphorylierung mehrere Proteinkinasen beteiligt sind.
Diese Annahme konnte durch in vivo Versuche bestätigt werden: Substanzen, die keine Wirkung auf den "second messenger" cAMP haben, wurden zu Zellkulturen gegeben, nach einer kurzen Zeit wurde eine Steigerung des Phosphorylierungsgrades von S6 beobachtet (29,30, 31,32).

In der vorliegender Arbeit solten die Phosphorylierungsstellen von S6 durch tryptische Verdauung charakterisiert werden, um die intrazellulären biologischen Vorgänge - wie Proteinkinase- und Phosphataseaktivitäten und die Funktion der einzelnen Phosphorylierungstellen von S6 - besser verstehen zu können. Zunächst wurden die Phosphorylierungsstellen von S6, das in vivo phosphoryliert worden war, untersucht um einen Überblick über deren Anzahl zu erhalten, und zusätzlich wurden in vitro Phosphorylierungsstudien mit hochgereinigter cAMP abhängiger Protein-

kinase durchgeführt, die einen Anhaltspunkt liefern sollten, an wieviele und an welche Aminosäurereste dieses Enzym Phosphatmoleküle überträgt.

2. E R G E B N I S S E

2.1. VERTEILUNG DER MONO- UND POLYSOMEN VON HeLa- und MPC-11-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON TONIZITÄTSÄNDERUNGEN

Es ist bekannt, daß ein hoher Gehalt an Polysomen mit einem hohen Phosphorylierungsgrad des Proteins S6 korreliert (9,10,12). Um einen Überblick zu erhalten, wie die Verteilung der aktiven und inaktiven Ribosomen in stimulierten (mit 10% Serum) und in inhibierten (durch hypertonen Initiationsblock) Zellen ist, wurden die Ribosomen solcher behandelter Zellen im Sucrosegradienten in Mono- und Polysomen aufgetrennt (Abb. 2). Werden die Zellen mit Serum stimuliert, sind etwa 75% der Ribosomen in Polysomen enthalten; wird die NaCl-Konzentration im Medium um 120 mM (Endkonzentration 240 mM) erhöht, sind fast sämtliche Ribosomen in Monosomen enthalten. Dieses Phänomen wurde bei HeLa- und bei MPC-11-Zellen beobachtet.

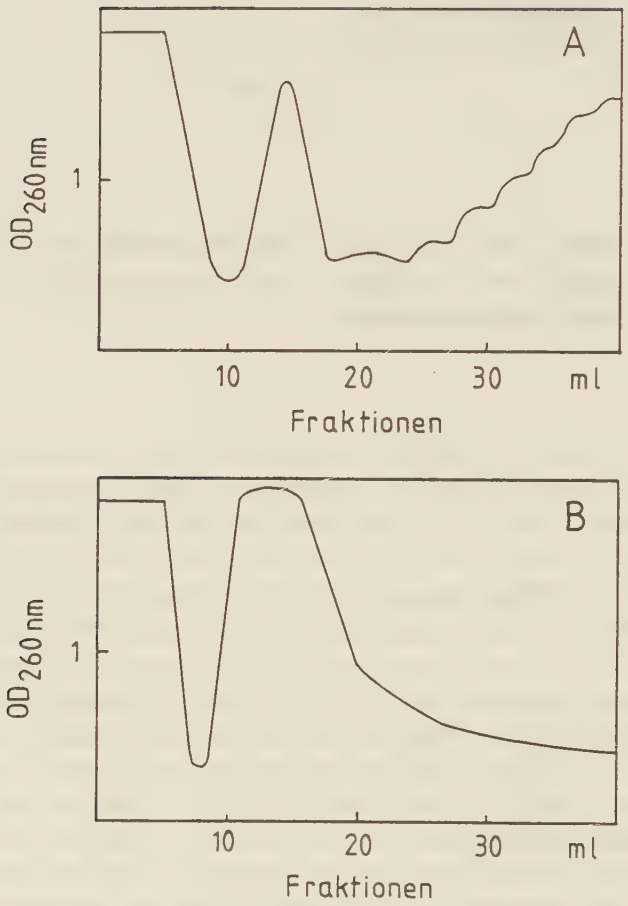


Abb.2: Verteilung von Mono- und Polysomen in stimulierten und inhibierten Zellen.
A: MPC-11-Zellen mit einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen/ml wurden zur Stimulierung der Proteinsynthese 1h mit 1/10 Volumen fötalem Kälberserum versetzt, Ribosomen wurden wie in 4.2.4. beschreiben isoliert.
B: MPC-11-Zellen mit einer Zelldichte von 1 x 10^6 Zellen/ml wurden zur Inhibierung der Proteinsynthese 15 min durch Zugabe von 4 M NaCl auf eine zusätliche NaCl-Konzentration von 120 mM gebracht, wie in 4.2. 1.2. beschrieben.

Die Trennung von Mono- und Polysomen in ihre ribosomalen Untereinheiten (40S und 60S) erfolgte wiederum durch Zentrifugtion im Sucrosegradienten (Abb. 3).

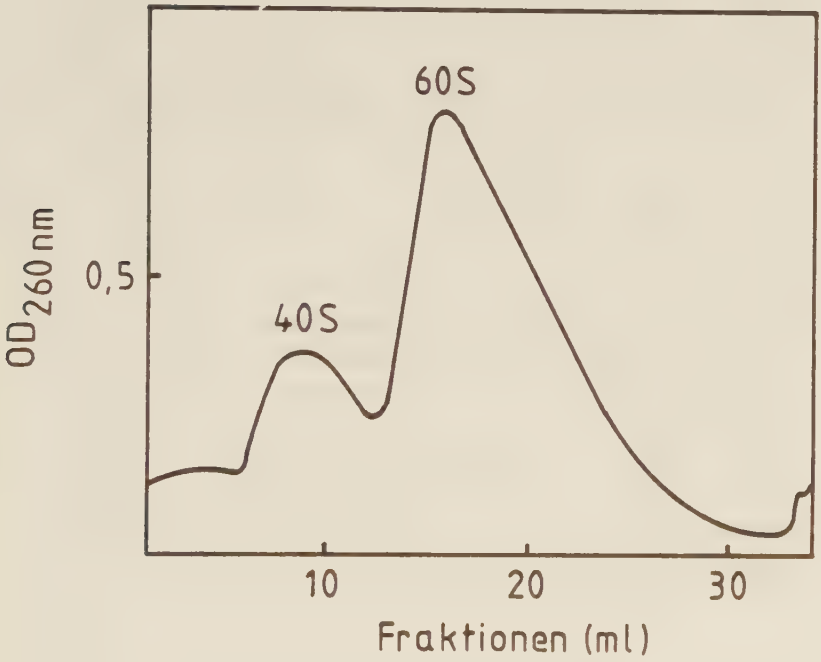


Abb.3: Dissoziation von Polysomen in ribosomale Untereinheiten. Polysomen wurden aus stimulierten MPC-11-Zellen durch Zentrifugation im Sucrosegradienten gewonnen (Abb. 2A) und abzentrifugiert. Dann wurden die Polysomen in einem Puffer resuspendiert, der 500 mM KCl enthielt, mit 1/10 Volumen 10 mM Puromycinlösung versetzt und 15 min auf 37° C erwärmt wie in 4.2.5. beschrieben. Anschließend erfolgte Zentrifugation im Hochsalzsucrosegradienten.

2.2. DARSTELLUNG DES PHOSPHORYLIERUNGSGRADES VON S6 DURCH ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE

Das von Lastick und McConkey (33) verwandte zweidimensionale Gelsystem zur Auftrennung der basischen ribosomalen Proteine ist weit verbreitet, da anhand dieses zweidimensionalen Systems die Grundlage einer gemeinsamen Nomenklatur für ribosomale Mammalia-Proteine von McConkey et al. (11) geschaffen wurde. Das Protein S6 der kleinen ribosomalen Untereinheit wird durch dieses Gelsystem in mehrere Derivate a, b, c, d, e und f getrennt, die sich in ihrem Phosphorylierungsgrad unterscheiden. Mit Doppelmarkierungsversuchen (34,35) konnte gezeigt werden, daß S6 a keine Phosphatgruppe, S6 b eine, S6 c zwei, S6 d drei, S6 e vier und S6 f fünf Phosphatgruppen besitzen. Der Phosphorylierungsgrad von S6 läßt sich durch Verwendung des zweidimensionalen Gelsystems eindeutig feststellen. Nach Anfärbung mit Coomassie Brillant Blau erkennt man S6 an dem zusätlichen zur Anode hinzeigenden Schweif. Ist S6 hochphosphoryliert, sind S6 d, e und f deutlich erkennbar und sehr weit anodial verschoben, ist S6 fast vollständig dephosphoryliert, treten meist nur S6 a und b auf.

2.2.1. In vivo phosphorylierte ribosomale Proteine

MPC-11- und HeLa-Zellen wurden wie in 4.2.1.1. beschrieben mit ^{32}P-Orthophosphat in vivo inkubiert und die Ribosomen wurden durch Zellfraktionierung gewonnen (4.2.3.). Die ribosomalen Proteine wurden extrahiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brillant Blau wurde das Gel fluorographiert. Abbildung 4 zeigt ein zweidimensionales Gel und die entsprechende Fluorographie.

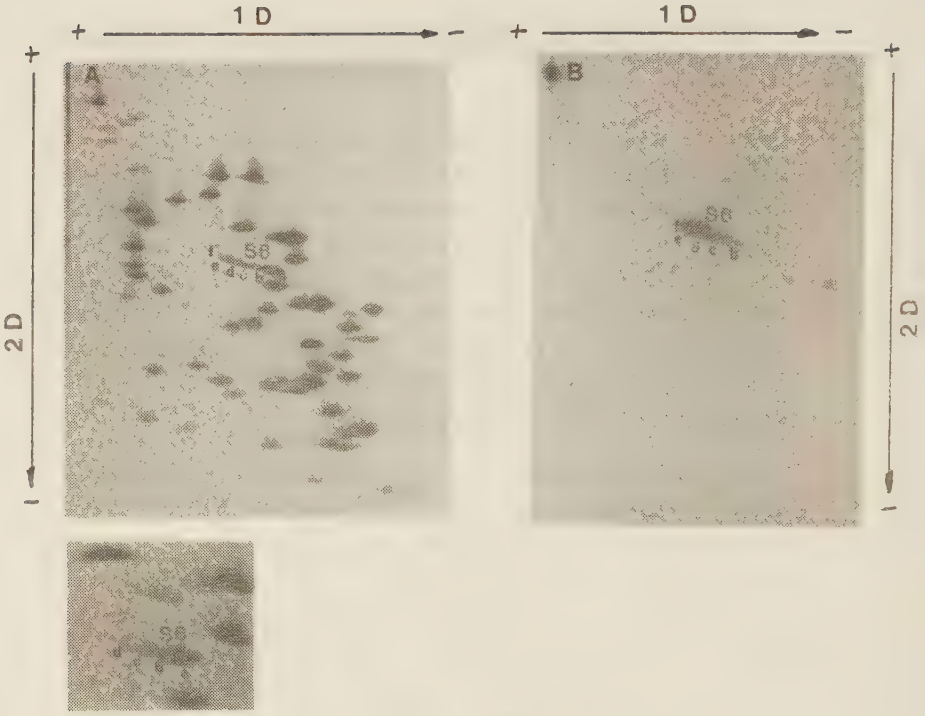


Abb. 4A: Zweidimensionale Auftrennung von ribosomalen Proteinen (500 µg) aus MPC-11-Zellen. Die Proteine wurden aus Zellen isoliert, die mit Serum stimuliert worden waren, so daß S6 hochphosphoryliert ist. Der kleine Ausschnitt daneben zeigt S6 in dephosphoryliertem Zustand, die Proteine wurden aus Zellen isoliert, die dem hypertonen Initiationsblock ausgesetzt worden waren.
Abb.4B: Fluorographie des Gels.

Das Fluorogramm von hochphosphoryliertem S6 zeigt deutlich, daß der überwiegende Teil der Radioaktivität in S6 d, e und f eingebaut wird, und daß außer S6 kein weiteres basisches ribosomales Protein mit ^{32}P-Phosphat markiert wird. Die einzelnen S6-Derivate wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Radioaktivität wurde durch Cerenkovzählung im Szintillationsspektrometer bestimmt.

Tabelle 1 zeigt die gemessenen cpm der einzelnen S6-Derivate

Tabelle 1: Radioaktivitätsverteilung von in vivo phosphorylierten S6-Derivaten

	a	b	c	d	e	f
Cerenkov-Zählung	10	54	88	164	282	550

Tabelle 1: Ribosomale Proteine (500 µg) aus HeLa-Zellen, die mit ^{32}P-Orthophosphat markiert worden waren, wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brillant Blau wurden die einzelnen S6-Derivate ausgeschnitten und ihre Radioaktivität durch Cerenkovzählung bestimmt.

2.2.2. In vitro Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen durch endogene Proteinkinasen

Für in vitro Phosphorylierungen wurden Ribosomen aus MPC-11- und HeLa-Zellen isoliert (4.2.3.) und ohne Hochsalzbehandlung mit ^{32}P- γ - ATP 30 min bei 30° C inkubiert. Dabei phosphorylieren endogene Proteinkinasen, die am Ribosom assoziiert sind, die Ribosomen. Nach Sedimentation der phosphorylierten Ribosomen wurden die ribosomalen Proteine extrahiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

Das Coomassie Brillant Blau angefärbte Proteinmuster entsprach fast dem Proteinmuster, wie es in Abbildung 4A zu sehen ist, S6 e und f besaßen allerdings eine geringere Farbintensivität. Abbildung 5 zeigt das Fluorogramm der in vitro durch endogene Proteinkinasen phosphorylierten ribosomalen Proteinen.

Abb.5: Fluorographie eines zweidimensionalen Gels auf dem die Proteine aus in vitro phosphorylierter Ribosomen mit endogenen Proteinkinasen aufgetrennt worden waren. Ribosomen (12,5 OD_{260}) aus HeLa-Zellen wurden mit 48 µCi ^{32}P-γ-ATP inkubiert. Die phosphorylierten Ribosomen wurden abzentrifugiert, Proteine extrahiert und zweidimensional aufgetrennt.

Bei der in vitro Phosphorylierung mit endogenen Proteinkinasen wird der überwiegende Teil der Radioaktivität in S6 c und d eingebaut, relativ wenig in S6 e und f. Außer S6 ist kein weiteres basisches ribosomales Protein mit ^{32}P-Phosphat markiert worden. In Tabelle 2 sind die durch Cerenkovzählung gemessenen cpm der ausgeschnittenen einzelnen S6-Derivate aufgeführt.

Tabelle 2: Radioaktivitätsverteilung von in vitro endogen phosphorylierten S6-Derivaten

	a	b	c	d	e	f
Cerenkov-zählung	35	198	1443	1271	645	493

Tabelle 2: Ribosomale Proteine (500 µg) aus Ribosomen, die in vitro durch endogene Proteinkinasen phosphoryliert worden waren, wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brillant Blau wurden die einzelnen S6-Derivate ausgeschnitten und jeweils die Radioaktivität nach Cerenkov bestimmt.

2.2.3. In vitro Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase

Für die in vitro Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase wurden die isolierten Ribosomen mit Hochsalz (500 mM KCl) behandelt (4.2.7.1.), dadurch werden am Ribosom assoziierte Proteine, wie Initiations-, Elongationsfaktoren und Proteinkinasen nahezu vollständig von den ribosomalen Untereinheiten entfernt. Die verbleibenden Proteine werden als integrale Bestandteile der ribosomalen Untereinheiten betrachtet.
Hochsalzgewaschene Ribosomen wurden für die in vitro Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase wie in 4.2.9. beschrieben eingesetzt. Zum Vergleich wurden auch die

40S-Untereinheit und bereits extrahierte ribosomale Proteine mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase inkubiert. Die phosphorylierten Ribosomem wurden abzentrifugiert, die ribosomalen Proteine extrahiert und zweidimensional aufgetrennt. Die phosphorylierten ribosomalen Proteine wurden mit 10% TCA präzipitiert und ebenso zweidimensional aufgetrennt. In Abbildung 6 sind die jeweiligen Fluorogramme der Gele dargestellt.

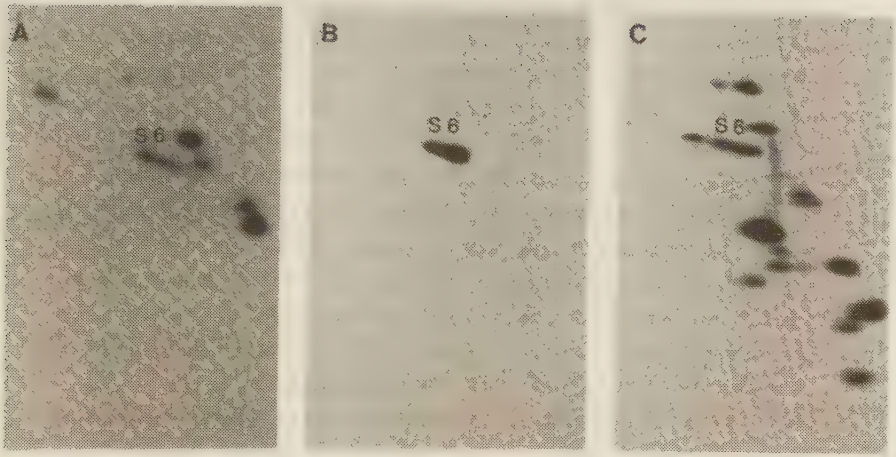


Abb.6: Fluorogramme zweidimensionaler Gele.
A: Proteine aus 80S Ribosomen, die durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren. Hochsalzgewaschene Ribosomen (12,5 OD_{260} = 500 µg) aus MPC-11-Zellen wurden mit 24 µCi ^{32}P-γ - ATP und 120 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase 30 min bei 30° C inkubiert. Die phosphorylierten Ribosomen wurden abzentrifugiert und die extrahierten Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.
B: Proteine aus der ribosomalen 40S-Untereinheit, die durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren. 40S-Untereinheiten (12,5 OD_{260} = 500 µg Protein), die aus MPC-11-Zellen wie in 4.7.5. beschrieben isoliert worden waren, wurden mit 24 µCi ^{32}P-γ - ATP und 120 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter A bereits beschrieben.
C: Proteine, die in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren. Ribosomale Proteine (500 µg), die aus Ribosomen (MPC-11-Zellen) extrahiert worden waren, wurden mit 24 µCi ^{32}P - γ - ATP und 120 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit 10% TCA präzipitiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

Das durch Coomassie Brillant Blau angefärbte Muster der drei Phosphorylierungsansätze zeigte keinen ins Auge fallenden Unterschied in der Anzahl der S6-Derivate. Die Fluorogramme zeigen jedoch folgende Unterschiede: wird die ribosomale 40S-Untereinheit in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert, wird nur S6 mit ^{32}P-Phosphat markiert (Abb. 6B); werden hochsalzgewaschene Ribosomen in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert, werden außer S6 vier weitere basische ribosomale Proteine mit ^{32}P-Phosphat markiert (Abb. 6A), diese zusätzlich radioaktiv markierten Proteine sind Proteine der 60S-Untereinheit, denn fehlt die 60S-Untereinheit bei der Inkubation mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase, wird nur S6 radioaktiv markiert. Werden bereits extrahierte ribosomale Proteine mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase inkubiert, werden erheblich mehr (zehn) Proteine mit ^{32}P-Phosphat markiert als bei der Inkubation mit biologisch intakten Ribosomen. Die Konformation der extrahierten ribosomalen Proteine ist ohne die rRNA verändert, so daß die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase mehr Substrate erreichen kann.

Die einzelnen S6-Derivate aller drei Phosphorylierungsansätze wurden aus den Gelen ausgeschnitten und ihre Radioaktivität durch Cerenkovzählung bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Radioaktivitätsverteilung von in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphorylierten S6-Derivaten.

	a	b	c	d	e	f
S6 aus in vitro phosphorylierten 80S Ribosomen gewonnen	2 038	14 568	14 804	13 454	12 249	11 447
S6 aus in vitro phosphorylierten 40S-Untereinheiten gewonnen	2 995	144 293	55 243	28 923	35 897	15 255
S6 aus in vitro phosphorylierten extrahierten ribosomalen Proteinen gewonnen	8 147	109 815	52 829	49 316	44 731	36 438

Tabelle 3: 12,5 OD_{260} hochsalzgewaschene 80S Ribosomen, 12,5 OD_{260} 40S-Untereinheiten und 500 µg ribosomale Proteine wurden je mit 24 µCi ^{32}P-γ-ATP und 120 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase inkubiert. Ribosomen und 40S-Untereinheit wurden abzentrifugiert und die extrahierten Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt; die bereits extrahierten ribosomalen Proteine wurden mit 10% TCA präzipitiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brillant Blau wurden die einzelnen S6-Derivate ausgeschnitten und die Radioaktivität nach Cerenkov bestimmt.

Bei den Phosphorylierungen in vitro durch endogene Proteinkinasen und durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase ist der überwiegende Teil der Radioaktivität in S6 b, c und d zu finden, bei der Phosphorylierung in vivo in S6 e und f. Der hohe Phosphorylierungsgrad des S6 Proteins der in vivo erreicht wird, konnte in vitro nicht erreicht werden. Dies deutet darauf hin, daß S6 sehr wahrscheinlich in vivo durch mehrere Proteinkinasen phosphoryliert wird.

2.3. S6 PHOSPHORYLIERUNG MIT DER KATALYTISCHEN UNTEREINHEIT DER cAMP ABHÄNGIGEN PROTEIN-KINASE

2.3.1. Kinetik der S6 Phosphorylierung

Die Kinetik der in vitro Phosphorylierung von S6 durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase wurde untersucht.
Ribosomen, die mit Hochsalz behandelt worden waren, und extrahierte ribosomale Proteine wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und ^{32}P- γ - ATP inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (2, 5, 10, 20 min) wurden Proben entnommen und die ribosomalen Proteine durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbilding 7 ist das Fluorogramm dieses Gels abgebildet.

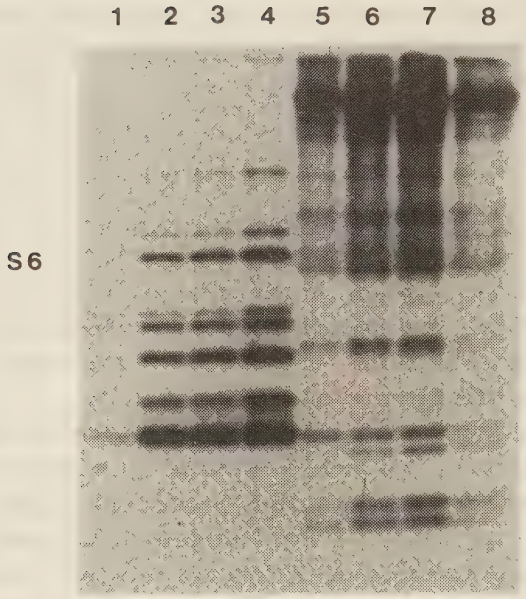


Abb. 7: Fluorogramm eines 12-18% Polyacrylamidgels. Spur 1-4: in vitro Phosphorylierung von ribosomalen Proteinen. 200 ug ribosomale Proteine wurden mit 48 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und 9,6 µCi ^{32}P- γ - ATP inkubiert. Nach 2, 5, 10 und 20 min wurden Proben entnommen, die Proteine mit 10% TCA präzipitiert und durch eindimensionale SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.
Spur 5-8: in vitro Phosphorylierung von Ribosomen. 5 OD_{260} hochsalzgewaschene Ribosomen wurden mit 48 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und 9,6 µCi ^{32}P- γ - ATP inkubiert. Nach 2, 5, 10 und 20 min wurden Proben entnommen, Ribosomen abzentrifugiert und die ribosomalen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Auf dem Fluorogramm erkennt man, daß die S6-Bande nach 5 min Inkubationszeit bei beiden Phosphorylierungsansätzen deutlich zu sehen ist.
Im Gegensatz zu der bisher gezeigten zweidimenionalen Gelelektrophorese, durch die nur basische ribosomale Proteine aufgetrennt werden, ermöglicht die Behandlung mit SDS die Auftrennung aller Proteine. Das ist der Grund, weshalb auf den Spuren des Gels, wo die Proteine der phosphorylierten Ribosomen aufgetrennt wurden, so viele radioaktiv markierte Proteinbanden zu erkennen sind. Die Banden oberhalb der S6-Bande entsprechen höchstwahrscheinlich Proteinen, die trotz Hochsalzbehandlung noch an den Ribosomen assoziiert waren. Wird derselbe Ansatz auf einem zweidimensionalen Gel aufgetrennt, findet man außer S6 noch vier weitere ribosomale Proteine, die mit ^{32}P-Phosphat markiert worden sind (Abb. 6A).

2.3.2. Inhibierung der S6 Phosphorylierung

Die Reinheit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase, d.h. ihre Kontamination mit anderen Proteinkinasen wurde untersucht.
Zwei Inhibitoren, die spezifisch die cAMP abhängige Proteinkinase inhibieren, wurden jeweils zu einem Phosphorylierungsansätz zugegeben:
1.Polyglutamat, (36)
2.Angereicherter Inhibitor nach Gilman (37)
In beiden Ansätzen wurde der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung verfolgt. Die extrahierten Proteine wurden auf eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelen (12-18%) aufgetrennt. Aus den angefärbten Gelen

wurden die S6-Banden ausgeschnitten und ihre Radioaktivität durch Cerenkovzählung im Szintillationsspektrometer bestimmt.

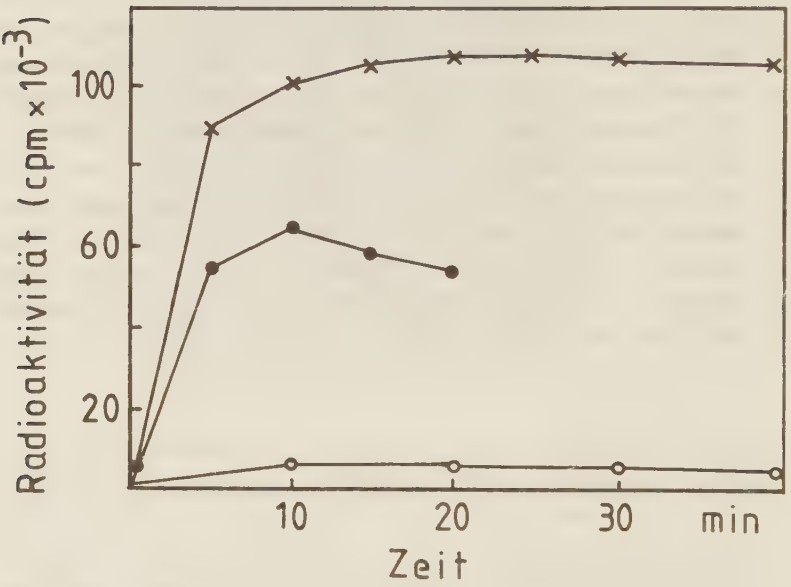


Abb. 8: Inhibierung der S6 Phosphorylierung. x Kontrolle, ● mit Polyglutamat, o angereicherter Inhibitor nach Gilman. 200 µg ribosomale Proteine wurden mit 48 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und 9,6 µCi ^{32}P- γ - ATP inkubiert, zu einem Ansatz wurde Polyglutamat zugegeben und zu einem anderen der angereicherte Inhibitor nach Gilman. Nach 5, 10, 15 und 20 min wurden Proben entnommen, die Proteine mit 10% TCA präzipitiert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die angefärbte S6-Bande wurde ausgeschnitten und die Radioaktivität nach Cerenkov bestimmt. Die Cerenkovzählung wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Beide Inhibitoren hemmen die S6 Phosphorylierung. Durch den angereicherten Inhibitor nach Gilman wird die Enzymaktivität fast vollständig gehemmt.
Im dem nächsten Versuch wurde nun Spermin, ein Inhibitor, der spezifisch Ca^{2+}-abhängige Proteinkinasen inhibiert (36), zu einem Phosphorylierungsansatz gegeben. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob ribosomale Proteine im Stande sind sich selbst zu phosphorylieren. Zu diesem Zweck wurden ribosomale Proteine mit Essigsäure extrahiert und anschließend mit ^{32}P-γ-ATP inkubiert. In beiden Versuchen wurden die Proteine eindimensional aufgetrennt (Abb. 9).

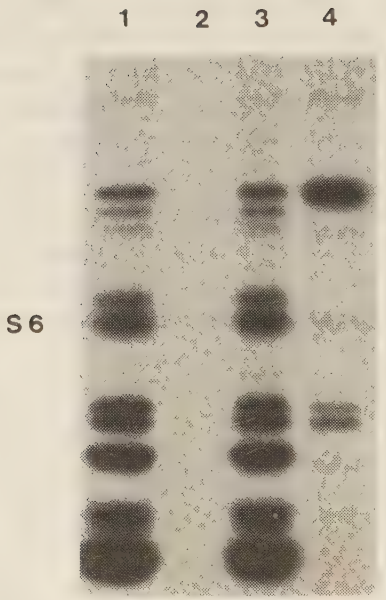


Abb. 9: Fluorogramm eines 12-18% SDS-Polyacrylamidgels.
Spur 1: Kontrollansatz: 50 µg ribosomale Proteine wurden mit 12 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und 2,4 µCi ^{32}P-γ - ATP inkubiert.
Spur 2: Ansatz ohne katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase.
Spur 3: Ansatz mit Spermin (0,5 mM).
Spur 4: Ansatz mit Polyglutamat (50 µg/ml).
Bei allen Ansätzen wurde nach 30 min Inkubationszeit bei 30° C die Proteine mit 10% TCA präzipitiert und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

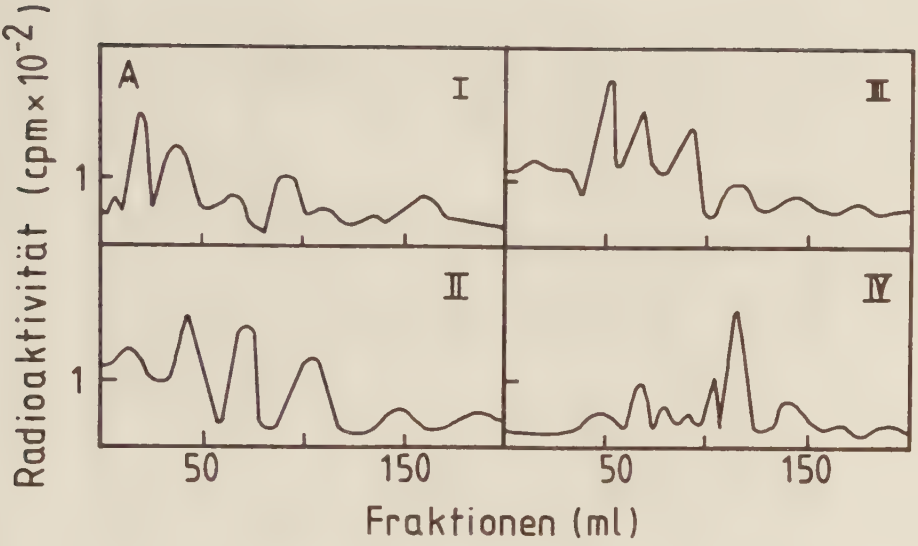
Auf dem Fluorogramm ist deutlich zu erkennen, daß die S6 Phosphorylierung durch Spermin nicht inhibiert wird, aber durch Polyglutamat. Eine Autophosphorylierung von ribosomalen Proteinen findet nicht statt, denn auf Spur 2 des Fluorogramms sind keine radioaktiv markierte Proteinbanden zu sehen.

2.4. AUFTRENNUNG DER TRYPTISCHEN PHOSPHOPEPTIDE DURCH DEAE-TRISACRYL-SÄULEN

Da mehrere Phosphatgruppen auf S6 übertragen werden, sollte die Frage untersucht werden, an welchen Stellen des Proteins S6 das Phosphat gebunden werden kann. S6, das in vivo durch Inkubation der Zellkulturen mit ^{32}P-Orthophosphat und in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und durch endogene Proteinkinasen phosphoryliert worden war, wurde aus angefärbten zweidimensionalen Gelen ausgeschnitten; sowohl unfraktioniertes S6 als auch fraktionierte S6-Derivate. Nach Äquilibrierung der Gelstücke mit einem alkalischen Puffer folgte eine vollständige Spaltung mit Trypsin (4. 2. 15.). Trypsin ist eine Protease aus dem Dünndarm mit Serin und Histidin im aktiven Zentrum. Trypsin spaltet spezifisch nur Lysyl- und Arginylbindungen und zwar so, daß alle entstehenden Peptide Lysin oder Arginin als Carboxy-endständige Aminosäure aufweisen (ausgenommen natürlich das ursprüngliche Carboxyende).

Die tryptischen Phosphopeptide von S6 wurden über eine DEAE-Trisacryl-Säule getrennt. Bei einer niederen Ionenstärke werden Anionen an das Säulenmaterial gebunden, die dann durch einen linearen Gradienten von ansteigender Ionenstärke (Leitfähigkeit stieg von 3 auf 15 mS an) wieder vom Säulenmaterial dissoziiert werden. Phosphopeptide, die wenig negativ geladen sind, werden zuerst vom Säulenmaterial abdissozieren; je negativer ein Peptid geladen ist, desto später wird es von der Säule eluieren. Die Radioaktivität der Säulenfraktionen wurde im Szintillationsspektrometer nach Cerenkov gemessen und so die radioaktiven Phosphopeptide lokalisiert.

In den folgenden Abbildungen sind Chromatogramme von tryptischen Phosphopeptiden, die über Anionenaustauscher getrennt wurden, dargestellt. Die erste Abbildung (10A) zeigt die tryptischen Phosphopeptide fraktionierter S6-Derivate. S6 war unter in vivo Bedingungen phosphoryliert worden. Bei S6 b sind zwei Radioaktivitätsgipfel, bei S6 c und d sind vier zu erkennen, bei den Phosphopeptiden, die aus S6 e und f stammen, sind sechs zu sehen.
Abbilding 10 B zeigt das Phosphopeptidmuster, das aus S6, welches aus einer in vitro Phosphorylierung mit endogenen Proteinkinasen stammt, gewonnen worden war.
In Abbilding 10 C ist das tryptische Phosphopeptidmuster einzelner S6-Derivate , die in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren, zu sehen.



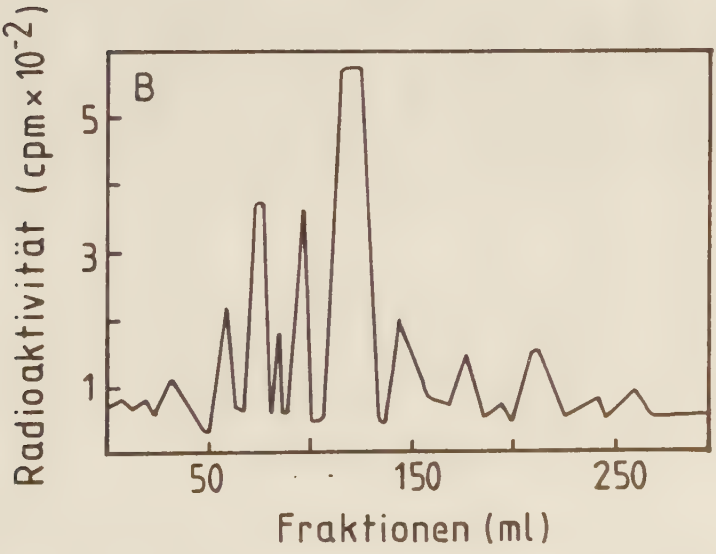


Abb. 10A und 10B

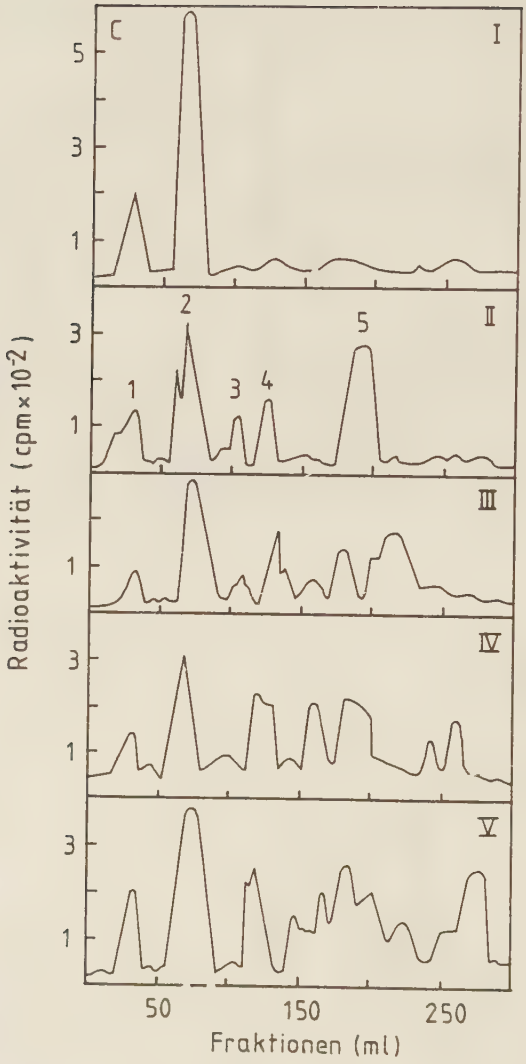

C
I
II
III
IV
V
1
2
3
4
5
Radioaktivität (cpm×10-2)
Fraktionen (ml)
50
150
250

Abb. 10C

Abb. 10: Tryptische Phosphopeptidmuster von unfraktioniertem S6 und fraktionierter S6-Derivate.
A: HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von 5 x 10^5 Zellen/ml waren 14 h lang mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und 1 h vor Aufarbeitung der Zellen mit Serum stimuliert worden, um hochphosphoryliertes S6 zu erhalten.
Ribosomen wurden isoliert, daraus die ribosomalen Proteine extrahiert und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Aus dem angefärbten Gel wurden die einzelnen S6-Derivate ausgeschnitten und die Gelstückchen mit Trypsin inkubiert. Die tryptischen Phosphopeptide wurden auf eine DEAE-Trisacryl-Säule aufgetragen. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde nach Cerenkov bestimmt, um die mit ^{32}P-Phosphat markierten Peptide zu lokalisieren. Die Radioaktivität wurde gegen die Anzahl der Fraktionen aufgetragen.
I: S6 b, II: S6 c, III: S6 d, IV: S6 e und f.
B: Ribosomen, die aus HeLa-Zellen isoliert worden waren, wurden mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert und anschließend abzentrifugiert. Die extrahierten ribosomalen Proteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt, unfraktioniertes S6 aus dem Gel herausgeschnitten und mit Trypsin gespalten. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.
C: Ribosomen, die aus HeLa-Zellen isoliert worden waren, wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert und anschließend abzentrifugiert. Die extrahierten ribosomalen Proteine wurden durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.
I: S6 b, II: S6 c, III: S6 d, IV: S6 e, V: S6 f

Mit Hilfe von Doppelmarkierungsversuchen wurde nachgewiesen, daß S6 b eine Phosphatgruppe, S6 c zwei, S6 d drei, S6 e vier und S6 f fünf Phosphatgruppen enthält (34, 35). Denmach müßte bei S6 b nur ein Radioaktivitätsgipfel, bei S6 c nur zwei usw. zu sehen sein. Aber sowohl auf dem Phosphopeptidmuster von S6 b, das in vivo, als auch von S6 b, das in vitro phosphoryliert worden war, sind jeweils zwei Radioaktivitätsgipfel zu erkennen. Auf dem Phosphopeptidmuster von S6 c, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war, sind sogar fünf Radioaktivitätsgipfel zu sehen.
Es sind also mehr Phosphopeptide vorhanden als man erwarten würde. Ein Grund dafür könnte die Heterogenität von S6 sein, das bedeutet, daß für ein Phosphatmolekül mehrere Bindungsmöglichkeiten innerhalb des S6 Proteins existieren. Die Primärstruktur der 18 Aminosäuren am C-terminalen Ende von S6, die von Wettenhall und Morgan (38) aufgeklärt wurde, gibt z.B. sieben potentielle Phosphorylierungsstellen an, ein Threonin und sechs Serine. Wieviele Phosphorylierungsstellen im S6 vorhanden sind, könnte durch eine Aminosäuresequenzanalyse geklärt werden. Die Phosphorylierungsstellen innerhalb der Phosphoproteine sollen immer dicht benachbart sein (39), deshalb ist ein weiterer Punkt, ob Trypsin tatsächlich immer spezifisch spaltet, denn befindet sich in der Nähe von Lysin und Arginin ein oder zwei phosphorylierte Serine, könnte die Sensivität für Lysin oder Arginin verloren gegangen sein (40).

2.5. AUFTRENNUNG DER TRYPTISCHEN PHOSPHOPEPTIDE DURCH ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG

Bei der isoelektrischen Fokussierung wird unter Verwendung künstlicher Ampholyte ein pH-Gradient aufgebaut. In diesem pH-Gradient bewegt sich jedes Peptidmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt entspricht.
Tryptische Phosphopeptide aus unfraktioniertem S6 und den fraktionierten S6-Derivaten wurden wie in 4.2.15. beschrieben gewonnen und durch isoelektrische Fokussierung analysiert. Das Fluorogramm einer isoelektrischen Fokussierung ist in Abbildung 11 zu sehen.

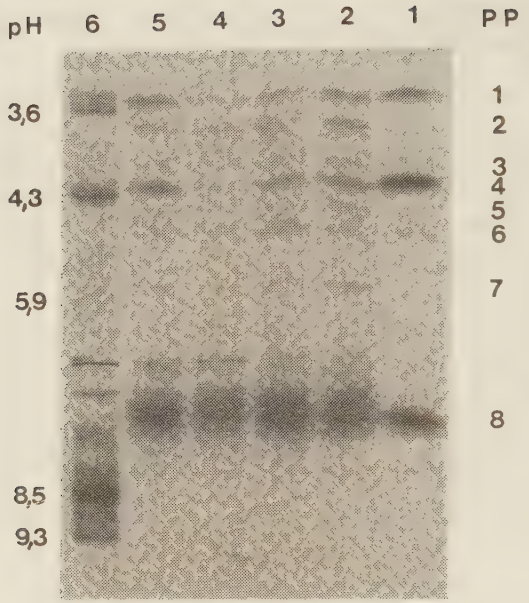


Abb. 11: Fluorographie der isoelektrischen Fokussierung von tryptischen Phosphopeptiden aus fraktioniertem und unfraktioniertem S6. S6 wurde über zweidimensionale Gelelektrophorese aus MPC-11-Zellen gewonnen, die mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und mit Serum stimuliert worden waren. Das ausgeschnittene S6 und die ausgeschnittenen S6-Derivate wurden mit Trypsin gespalten. Danach waren die tryptischen Phosphopeptide in 50 mM Triethylammoniumbicarbonat gelöst, sie wurden mehrmals lyophilisiert und so in H_2O gelöst, daß für die isoelektrische Fokussierung 10 µl gelöste tryptische Phosphopeptide mit ca. 400 cpm (Cerenkovzählung) aufgetragen werden konnten.
Spur 1: S6 b, Spur 2: S6 c, Spur 3: S6 d, Spur 4: S6 e und f, Spur 5: unfraktioniertes S6, Spur 6: Proteinmarkergemisch.

Bei der Auftrennung der tryptischen Phosphopeptiden von S6 b durch Isoelektrische Fokussierung und durch die zuvor gezeigte DEAE-Trisacrylsäule, erkennt man zwei Phosphopeptide, die durch ihre intensive radioaktive Markierung auffallen:
S6 Phosphopeptid (PP) 4 mit dem IP 4,3 und PP8 mit dem IP von 6,4. Bei S6 c sind acht Phosphopeptide zu erkennen, ebenso bei S6 d, S6 e und f und auch bei unfraktioniertem S6 sind acht Phosphopeptide zu erkennen.
Das Phosphopeptidmuster des S6 Proteins, das aus menschlichen Zellen (HeLa) gewonnen worden war, enstprach dem Muster aus Mäusezellen (MPC).
Abbildung 12 zeigt Phosphopeptide des S6 Proteins, das aus Ribosomen, die in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war, isoliert wurde.

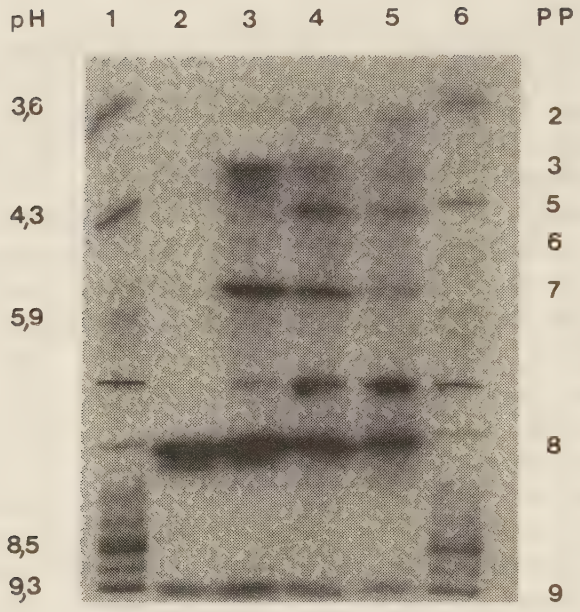


Abb. 12: Fluorographie der Isoelektrischen Fokussierung von tryptischen Phosphopeptiden aus S6-Derivaten, die in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren. Die tryptischen Phosphopeptide wurden wie in Abb. 11 beschrieben gewonnen.
Spur 1: Markergemisch, Spur 2: S6 b, Spur 3: S6 c, Spur 4: S6 d, Spur 5: S6 e, Spur 6: Markergemisch.

Spur 2 der Abbildung 12 zeigt die Phosphopeptide von S6 b, es sind zwei radioaktiv markierte Banden zu sehen, PP8 mit dem IP von 6,4 und PP9 mit dem IP von 9,3. Auf den sich anschließenden Spuren, die den Phosphopeptiden von S6 c, S6 d, S6 e und f entsprechen, sind jeweils sieben Phosphopeptidbanden zu erkennen.

Die letzte Abbildung in diesem Kapitel zeigt einen Vergleich der Phosphopeptide von S6, das unterschiedlich phosphoryliert worden war: 1. in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase, 2. in vivo und 3. in vitro durch endogene Proteinkinasen.

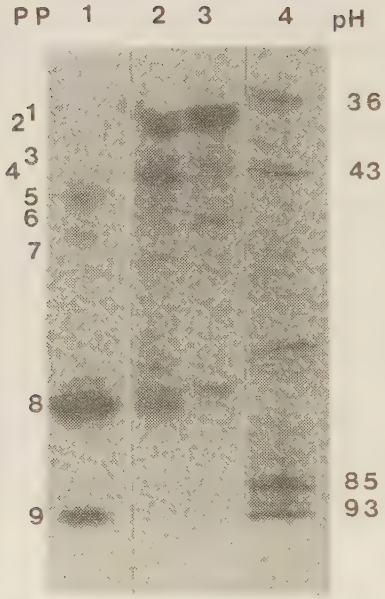


Abb.13: Fluorographie der Isoelektrischen Fokussierung von tryptischen Phosphopeptiden aus unfraktioniertem S6 aus HeLa-Zellen.
Spur 1: Phosphopeptide von S6, das in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Protein kinase phosphoryliert worden war.
Spur 2: Phosphopeptide von in vivo phosphoryliertem S6.
Spur 3: Phosphopeptide von S6, das in vitro durch endogene Proteinkinasen phosphoryliert worden war.
Spur 4: Markergemisch

Bei den Phosphopeptiden von S6, das in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war, fallen drei stark radioaktiv markierte Banden auf. Auf drei Phosphopeptide, PP7 mit IP 5,7 sowie PP8 mit IP 6,4 und PP9 mit IP 9,3 überträgt die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase in vitro Phosphatgruppen. Diese Beobachtungen entsprechen Ergebnissen von Wettenhall und Morgan (38). Diese Autoren beobachteten ebenfalls drei Phosphopeptide nach in vitro Phosphorylierung von Rattenleberribosomen mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase: Monophosphopeptid IP 8,2, Diphosphopeptid IP 7,3 und ein Triphosphopeptid IP 5,0.
Das Phosphopeptidmuster von S6, das in vitro durch endogene Proteinkinasen phosphoryliert worden war, deutet darauf hin, daß endogene Proteinkinasen S6 in vitro an drei Stellen phosphorylieren: PP1 IP 3,5 sowie PP2 IP 3,7 und PP6 IP 5,0.
Bei der S6 Phosphorylierung in vivo sind nach diesen Ergebnissen mehrere Proteinkinasen beteiligt. Zwei Phosphorylierungsstellen werden in vivo höchstwahrscheinlich von der cAMP abhängigen Proteinkinase erkannt, PP8 und PP7. Wie bereits oben aufgeführt werden in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase drei Phosphorylierungsstellen des S6 Proteins erkannt, PP9, PP8 und PP7. PP9 konnte nur bei S6, das in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war, nachgewiesen werden, nicht bei in vivo phosphoryliertem S6 und auch nicht bei S6, das in vitro durch endogene Proteinkinasen phosphoryliert worden war. In Tabelle 4 sind alle Phosphopeptide der unterschiedlichen Phosphorylierungsansätze aufgeführt.

Tabelle 4: Isoelektrische Punkte tryptischer Phosphopeptide von S6, die aus unterschiedlichen Phosphorylierungsansätzen gewonnen worden waren.

Phospho-peptide (PP)	in vivo phosphoryliertes S6	in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertes S6	in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertes S6
PP1	3,5	-	3,5
PP2	3,7	3,7	3,7
PP3	4,0	4,0	4,0
PP4	4,3	-	4,3
PP5	4,5	4,5	-
PP6	5,0	5,0	5,0
PP7	5,7	5,7	-
PP8	6,4	6,4	6,4
PP9	-	9,3	-

Tabelle 4: In vivo phosphoryliertes S6: S6 wurde aus MPC-11-Zellen gewonnen, die mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert worden waren. Nach Auftrennung der extrahierten ribosomalen Proteine wurde S6 aus dem angefärbten Gel ausgeschnitten und mit Trypsin gespalten. Anschließend wurden die tryptischen Phosphopeptide durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt und ihre isoelektischen Punkte bestimmt.
In vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertes S6: Hochsalzgewaschene Ribosomen wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und ^{32}P-γ-ATP inkubiert und nach der Inkubationszeit abzentrifugiert. Ribosomale Proteine wurden extrahiert, die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.
In vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertes S6: Ribosomen wurden mit ^{32}P-γ-ATP inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Ribosomale Proteine wurden extrahiert, die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

S6, das in vivo phosphoryliert worden war, besitzt acht Phosphopeptide; S6, das in vitro mit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war, besitzt sieben und S6, das in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert worden war, besitzt sechs Phosphopeptide. Nur ein Phosphopeptid, PP9 mit IP 9,3 das bei der in vitro S6 Phosphorylierung auftritt, ist bei den Phosphopeptiden der in vivo S6 Phosphorylierung nicht zu finden. Alle anderen Phosphopeptide der in vitro S6 Phosphorylierung entsprechen Phosphopeptiden der in vivo S6 Phosphorylierung.

2.6. ZWEIDIMENSIONALE AUFTRENNUNG DER TRYPTISCHEN PHOSPHOPEPTIDE DURCH DÜNNSCHICHTELEKTROPHORESE UND DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Bei dieser Trennmethode werden die tryptischen Phosphopeptide in Wasser gelöst und auf eine Cellulose-Platte aufgetragen. In der ersten Dimension wird eine Elektrophorese bei saurem pH durchgeführt, in der zweiten Dimension schließt sich eine Chromatographie an (4.2.16.2.). Die Cellulose-Platte wird getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert. Abbilding 14 zeigt das Fluorogramm tryptischer Phosphopeptide aus in vivo phosphoryliertem S6.

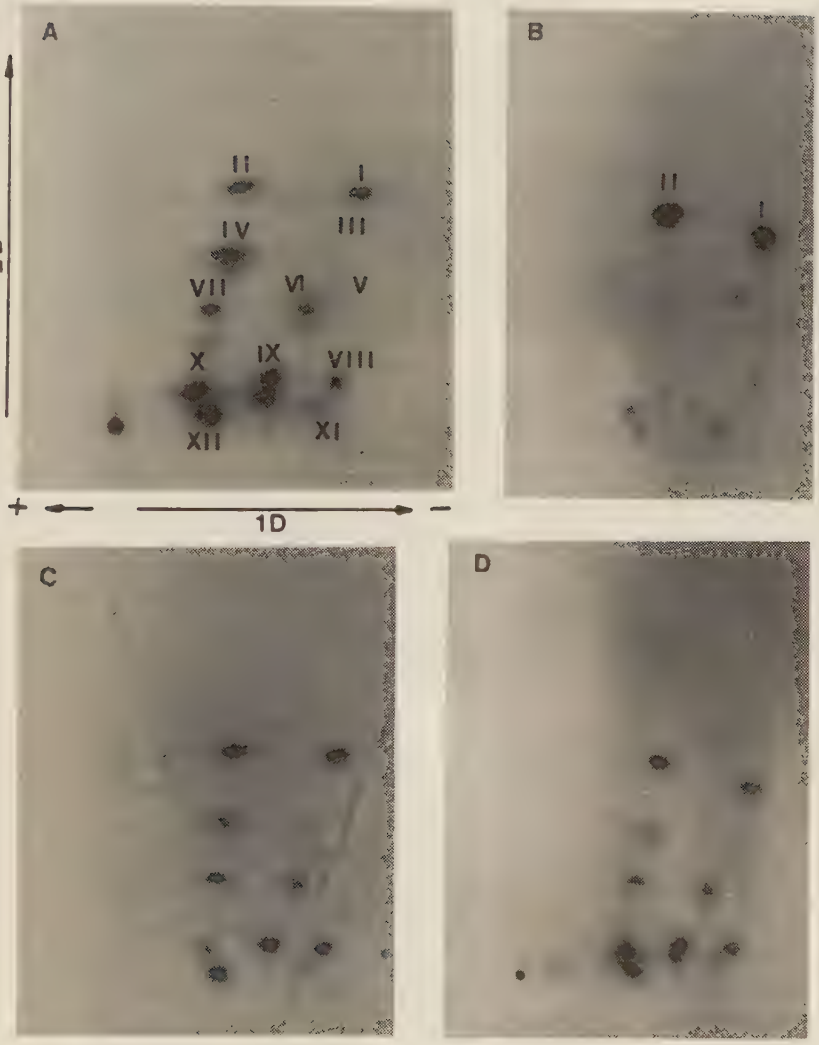


Abb. 14: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschichtelektrophoresen tryptischer Phosphopeptide aus in vivo phosphoryliertem S6. S6 war aus Hela-Zellen isoliert worden, die mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und mit Serum stimuliert worden waren.
A: unfraktioniertes S6, B: S6 b, C: S6 c, D: S6 d.

Auf dem Fluorogramm von unfraktioniertem S6 sind 12 radioaktiv markierte Phospopeptide zu erkennen, auf dem Fluorogramme von S6 b sind zwei, von S6 c zwölf und auf dem von S6 d sind auch zwölf Phosphopeptide zu sehen. Auffallend ist, daß die Anzahl der Phosphopeptide von S6 c gegenüber S6 b enorm zunimmt; bei der Auftrennung der Phosphopeptide durch die DEAE-Trisacryl-Säule ist das auch auffallend. Dies könnte wieder auf eine heterogene Phosphorylierung von verschiedenen S6 Molekülen hinweisen.
Die beiden folgenden Abbildungen zeigen Fluorogramme tryptischer Phosphopeptide des Proteins S6, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase und mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert worden war.

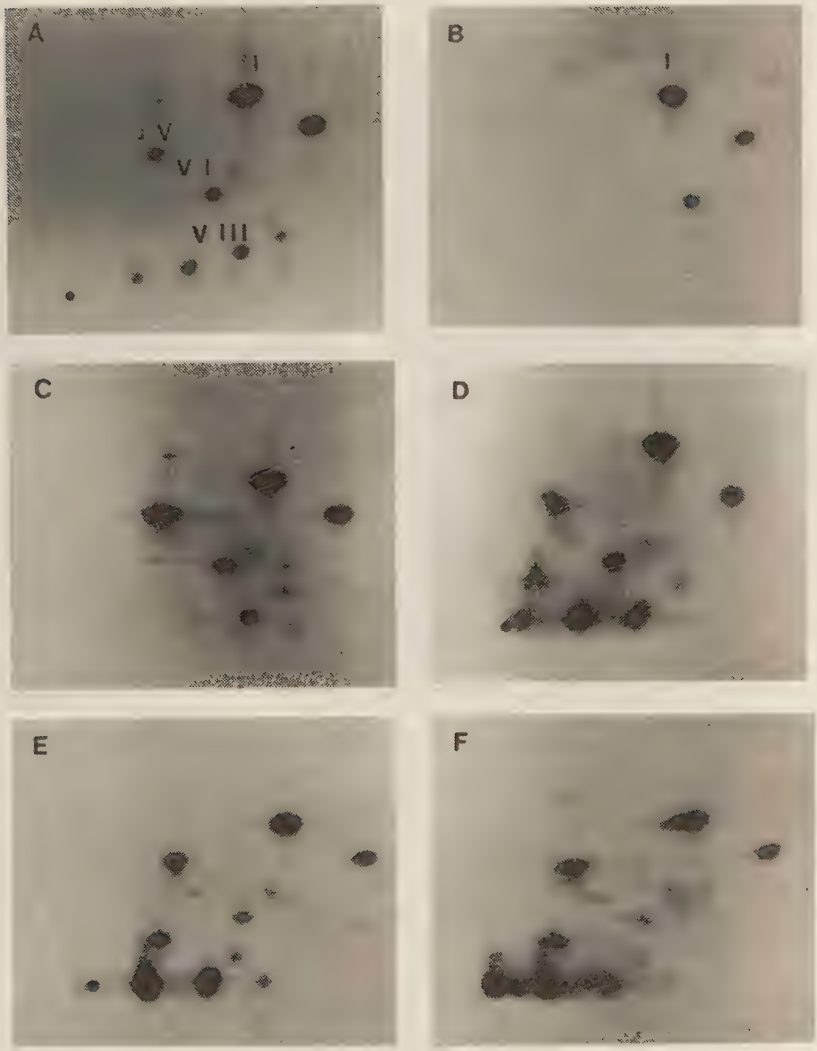


Abb. 15: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschichtelektrophoresen tryptischer Phosphopeptide von in vitro phosphoryliertem S6. S6 war aus hochsalzgewaschenen Ribosomen isoliert worden, die durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase mit ^{32}P-Phosphat markiert worden waren.
A: unfraktioniertes S6, B: S6 b, C: S6 c, D: S6 d, E: S6 e, F: S6 f.

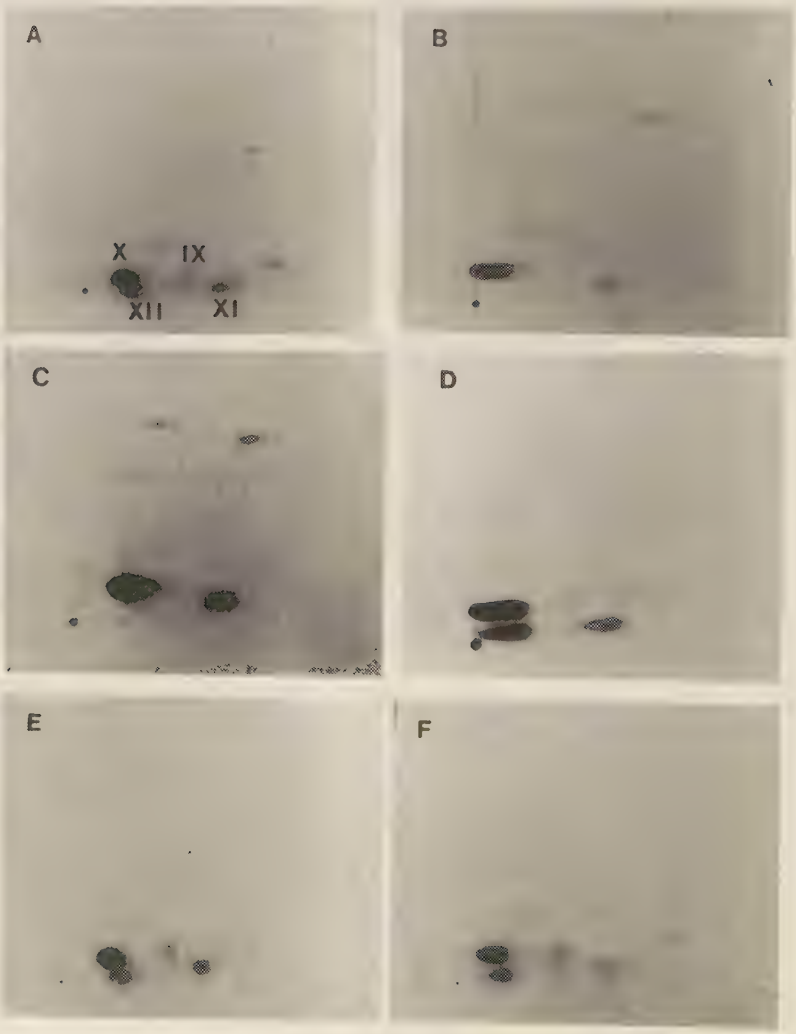


Abb. 16: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschicht-elektrophoresen tryptischer Phosphopeptide von in vitro phosphoryliertem S6. S6 war aus Ribosomen isoliert worden, die mit ^{32}P-γ-ATP inkubiert worden waren.
A: unfraktioniertes S6, B: S6 b, C: S6 c, D: S6 d, E: S6 e, F: S6 f.

Die Anzahl der tryptischen Phosphopeptide von S6 b ist bei in vivo und bei in vitro Bedingungen immer zwei. Bei S6 c steigt die Anzahl der Phosphopeptide gegenüber S6 b erheblich an und erreicht fast die Anzahl von unfraktioniertem S6. Bei allen Auftrennungen fällt dieses Ergebnis auf. Das Protein S6 war bei allen drei Phosphorylierungsansätzen aus einem zweidimensionalen Polyacrylamidgel, das mit Coomassie Brillant Blau angefärbt worden war, ausgeschnitten worden. Das unter in vivo Bedingungen phosphorylierte S6 zeigte alle S6-Derivate nach Anfärbung des Gels, S6 b war am schwächsten angefärbt, S6 d, e und f waren sehr stark angefärbt. Auf dem Fluorogramm (Abb. 4B) war gut zu erkennen, daß der überwiegende Teil der Radioaktivität in S6 d, e und f eingebaut worden war.

Die einzelnen S6-Derivate des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 waren alle gleich stark mit Coomassie Brillant Blau angefärbt worden. Das Fluorogramm entsprach diesem Muster (Abb. 6A).

Die einzelnen S6-Derivate des in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertem S6 waren alle gut unterscheidbar, aber besonders stark wurden S6 c und d angefärbt, die höher phosphorylierten S6-Derivate S6 e und f waren erheblich schwächer angefärbt worden. Der überwiegende Teil der Radioaktivität war in S6 c und d zu finden (Abb. 5).

Das in vivo phosphorylierte unfraktionierte S6 zeigt zwölf tryptische Phosphopeptide nach der Auftrennung der Phosphopeptide mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphorylierte S6 zeigt sechzehn und das in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphorylierte S6 zeigt zwölf tryptische Phosphopeptide.

Auf dem Phosphopeptidmuster des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 fallen zwei stark radioaktiv markierte Phosphopeptide auf, diese werden präferentiell durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert. Wird nur S6 b zweidimensional aufgetrennt, sind nur diese beiden Phosphopeptide zu erkennen. Das Phosphopeptid, das am weitesten zur Kathode gewandert ist, entspricht PP9 in der isoelektrischen Fokussierung mit dem IP 9,3; dieses Phosphopeptid tritt bei in vivo phosphoryliertem S6 weder in der zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese noch in der isoelektrischen Fokussierung auf. Das zweite stark radioaktiv markierte Phosphopeptid ist identisch mit dem Phosphopeptid I auf dem Phosphopeptidmuster des in vivo phosphoryliertem S6 und es entspricht PP8 in der isoelektrischen Fokussierung. Mindestens vier Phosphopeptide des in vivo phosphoryliertem S6 sind identisch mit Phosphopeptiden des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phoshoryliertem S6: I, IV, VI und VIII.

Auf dem Phosphopeptidmuster des in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertem S6 fällt auf, daß die stark radioaktiven Peptide in der Nähe des Auftragungspunktes liegen; sie tragen weniger positive Ladungen im Vergleich zu den beiden oben beschriebenen Phosphopeptiden, die weiter weg vom Auftragungspunkt in Richtung Kathode gewandert sind. Die endogenen Proteinkinasen phosphorylieren präferentiell die Peptide X und XII. Deutlich schwächer aber noch gut zu erkennen sind die Phosphopeptide IX und XI. Die Phosphopeptide, die mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert worden waren, verhalten sich bei allen Auftrennungen durch zweidimensionale Dünnschicht-

elektrophorese anders als die Phosphopeptide, die mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren. Da bei der in vitro Phosphorylierung mit endogenen Proteinkinasen, Ribosomen, die nicht mit Hochsalz gewaschen worden waren, miit ^{32}P- γ -ATP inkubiert wurden, muß man annehmen, daß die Proteinkinasen, die nach der Ribosomenisolierung noch an den Ribosomen assoziiert sind, kaum cAMP abhängige Proteinkinasen beinhalten.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die S6 Phosphorylierung durch ein vielfältiges Proteinkinasesystem erfolgt (41). Die cAMP abhängige Proteinkinase phosphoryliert in vivo mindestens eine Stelle des Proteins S6: Phosphopeptide I in dem Phosphopeptidmuster des in vivo phosphoryliertem S6. Phosphopeptid I entspricht wie bereits oben erwähnt in der isoelektrischen Fokussierung PP8 und bei der Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 durch DEAE-Trisacryl-Säule entspricht es dem zweiten Radioaktivitätsgipfel (Abb. 17).

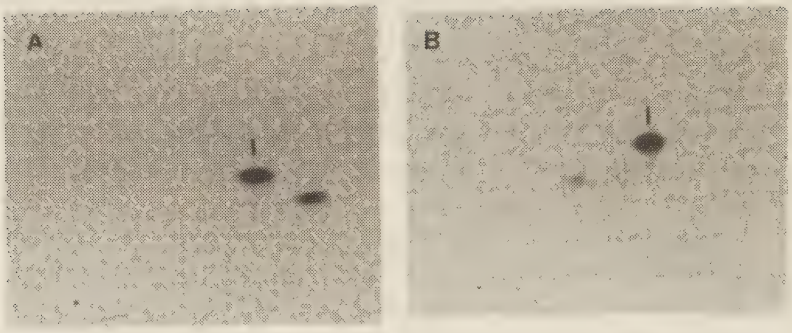


Abb. 17: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschicht-elektrophoresen von einzelnen Radioaktivitätsgipfeln der DEAE-Trisacryl-Säule tryptischer Phosphopeptide von in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 (Abb. 10C).
A: Radioaktivitätsgipfel 1 und 2 wurden getrennt lyophilisiert in je 10 µl H_2O, gelöst und je ein Aliquot zusammen auf eine Cellulose-Platte aufgetragen.
B: Radioaktivitätsgipfel 2, 3 und 4 wurden getrennt lyophilisiert, in je 10 µl H_2O gelöst und je ein Aliquot zusammen auf eine Cellulose-Platte aufgetragen.

2.7. AUFTRENNUNG DER TRYPTISCHEN PHOSPHOPEPTIDE DURCH ZWEIDIMENSIONALE DÜNNSCHICHTELEKTROPHORESE

Diese modifizierte zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese wird von einer Arbeitsgruppe in Basel (42) zur Auftrennung tryptischer Phosphopeptide aus S6 angewandt und zum Vergleich wurden tryptische Phosphopeptide des Proteins S6 nach dieser Methode aufgetrennt. Die erste Dimension ist eine Elektrophorese bei pH 1,5, die zweite Dimension ist ebenfalls eine Elektrophorese bei pH 3,5 (4.2.16.2).

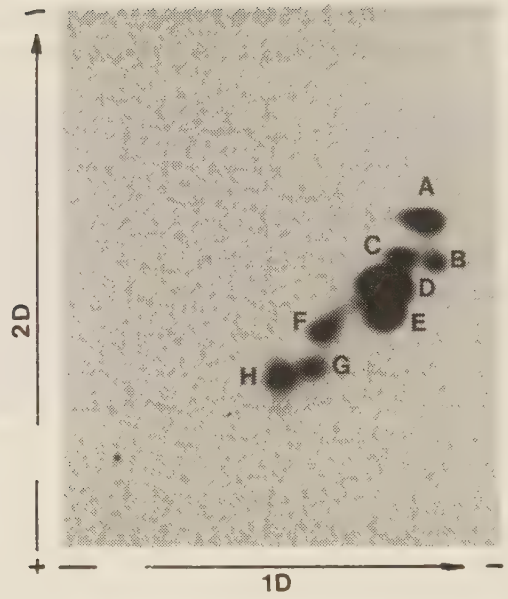


Abb. 18: Fluorogramm einer zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese tryptischer Phosphopeptide von in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6. Extrahierte ribosomale Proteine aus MPC-11-Zellen werden durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase mit ^{32}P-Phosphat markiert, über SDS-Gelelektrophorese wurde S6 isoliert und anschließend mit Trypsin gespalten.

Auf dem Fluorogramm sind deutlich acht Phosphopeptide zu erkennen. Die Phosphopeptide wurden einzeln aus der Cellulose-Platte herausgekratzt und die Radioaktivität nach Cerenkov im Spektrometer bestimmt. Die gemessene Radioaktivität ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Radioaktivitätsverteilung von in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphorylierten S6 Phosphopeptiden.

	PHOSPHOPEPTIDE							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Cerenkov zählung	298	79	123	2971	379	133	102	140

Tabelle 5: Ribosomale Proteine aus MPC-11-Zellen wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert, über Gelelektrophorese aufgetrennt, S6 aus dem angefärbten Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die tryptischen Phosphopeptide wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt und mit einem Röntgenfilm belegt. An Hand des Fluorogramms wurden die Phosphopeptide lokalisiert, einzeln ausgekratzt und deren Radioaktivität nach Cerenkov bestimmt.

Auffallend viel Radioaktivität wurde durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase in Phosphopeptid D eingebaut.
Abbildung 19 zeigt Posphopeptide einzelner S6-Derivate, die in vitro durch die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren, und durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt wurden.

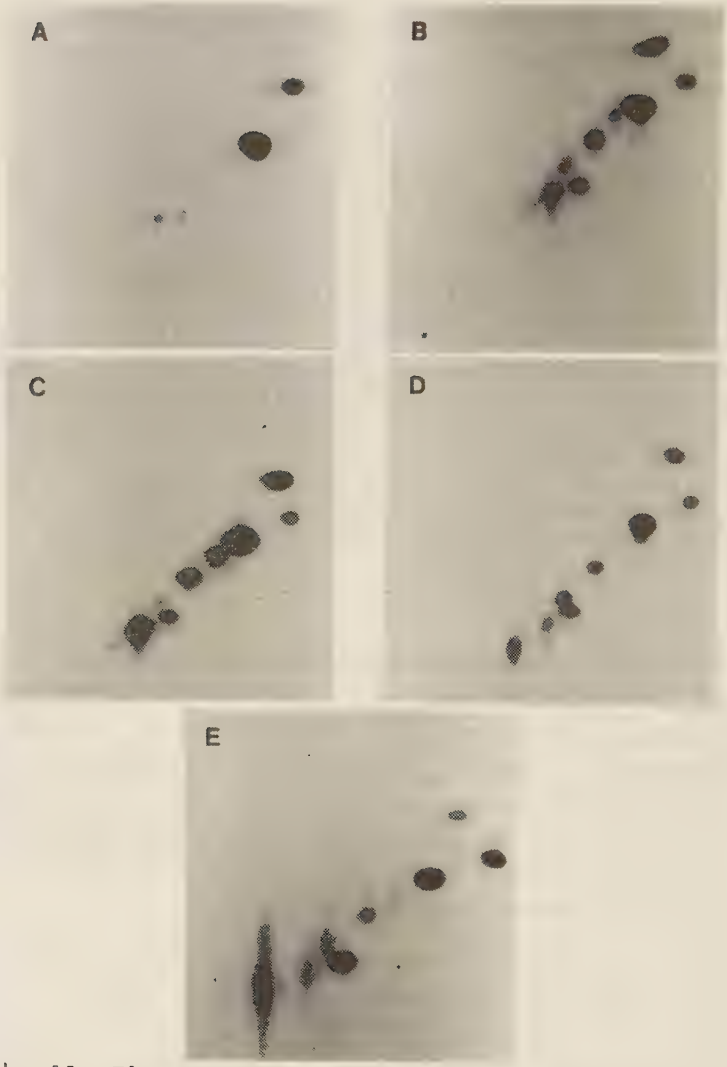


Abb. 19: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschicht-elektrophoresen tryptischer Phosphopeptide.
Extrahierte ribosomale Proteine aus MPC-11-Zellen wurden mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase mit ^{32}P-Phosphat phosphoryliert, S6 über zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und tryptisch gespalten.
A: S6 b, B: S6 c, C: S6 d, D: S6 e, E: S6 f.

Auf dem Fluorogramm von S6 b sind auch nach dieser zweidimensionalen Dünnschichtelektrophorese zwei Phosphopeptide zu erkennen. Die Anzahl der Phosphopeptide von S6 c nimmt gegenüber S6 b erheblich zu, die Phosphopeptidmuster von S6 d, e und f verhalten sich entsprechend.
Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da schon in den vorherigen Kapiteln auffiel, daß die Anzahl der Phosphopeptide bei S6 c bedeutend höher ist als bei S6 b; gegenüber S6 d, e, f und unfraktioniertem S6 nimmt die Anzahl so gut wie nicht zu.
Abbilding 20 zeigt Fluorogramme von tryptischen Phosphopeptiden aus in vivo phosphoryliertem S6.

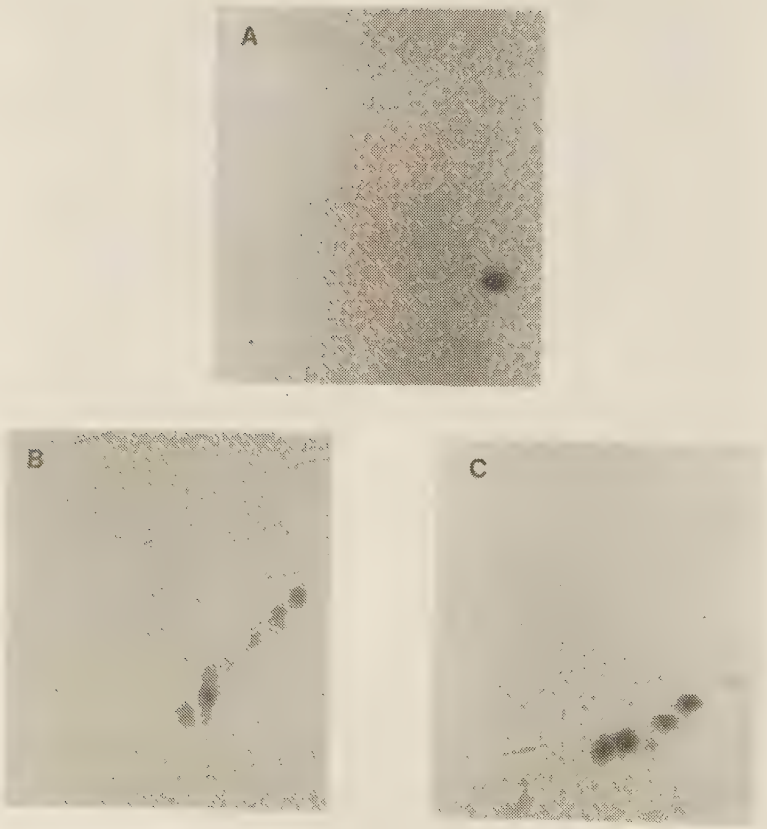


Abb. 20: Fluorogramme zweidimensionaler Dünnschicht-elektrophoresen tryptischer Phosphopeptide aus in vivo phosphoryliertem S6. MPC-11-Zellen wurden mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und mit Serum stimuliert. Die ribosomalen Proteine wurden über zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt, S6 ausgeschnitten und tryptisch verdaut.
A: S6 b, B: S6 c, C: S6 d.

Auch hier ist die Anzahl der Phosphopeptide von S6 c im Vergleich zu S6 b enorm angestiegen.

2.8. PHOSPHOAMINOSÄUREBESTIMMUNG TRYPTISCHER PHOSPHOPEPTIDE

Phosphoaminosäurebestimmungen wurden von S6 nach in vivo und in vitro Phosphorylierungen durchgeführt wie in 4.2.18. beschrieben. Bei allen Untersuchungen konnte nur Phosphoserin nachgewiesen werden (Abb. 21).

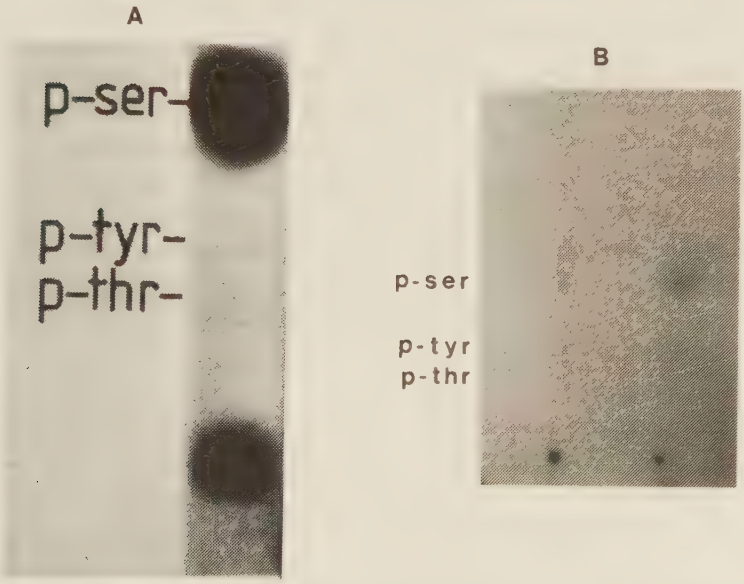


Abb. 21: Fluorogramme der Phosphoaminosäurebestimmung nach in vivo (A) und in vitro (B) Phosphorylierung von S6. In vivo und in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAM^r abhängigen Proteinkinase phosphoryliertes S6 wurde aus zweidimensionalen Gelen ausgeschnitten, tryptisch gespalten, ein Aliquot mit HCl 3 h lang hydrolisiert und durch Elektrophorese auf einer Cellulose-Platte aufgetrennt.
P-Ser = Phosphoserin; P-Tyr = Phosphotyrosin,
P-Thr = Phosphothreonin.

Identische Ergebnisse wurden auch von anderen Autoren beschrieben (38, 43). Eine Arbeitsgruppe publizierte, daß sie geringe Mengen an Phosphothreonin nachweisen konnte (42).

3. ZUSAMMENFASSUNG

Das basische Phosphoprotein S6 der kleinen ribosomalen Untereinheit wurde aus Zellkulturen (HeLa- und MPC-11-Zellen), die in vivo mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert worden waren, und aus Ribosomen, die in vitro mit endogenen Proteinkinasen und mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden waren, über ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese isoliert und anschließend vollständig mit Trypsin gespalten. Die tryptischen Phosphopeptide von S6 wurden durch unterschiedliche Methoden aufgetrennt: Anionenaustauscher, Isoelektrische Fokussierung, zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese und Dünnschichtchromatographie.

Eine gesteigerte Proteinbiosyntheserate korreliert mit einem gesteigerten Phosphorylierungsgrad von S6. Aus diesem Grund wurde bei den in vivo Versuchen die Proteinsynthese durch Serumzugabe stimuliert, um hochphosphoryliertes S6 zu erhalten. Die Verteilung der Mono- (inaktive Ribosomen) und Polysomen (aktive Ribosomen) innerhalb der Zellen wurde durch Zentrifugation im Sucrosegradienten bestimmt; ca. 75% der Ribosomen waren sowohl bei HeLa- als auch bei MPC-11-Zellen nach Serumstimulation in Polysomen enthalten (Abb.2).

Die mit Essigsäure extrahierten ribosomalen Proteine wurden durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Nach Anfärbung der Gele mit Coomassie Brillant Blau erschien S6 im eindimensionalen Gel als Bande bei 30 000 Dalton, in diesem Fall konnte unfraktioniertes S6 gewonnen werden.

Im zweidimensionalen Gel waren alle S6-Derivate (a, b, c, d, e, f) gut zu erkennen, in diesem Fall konnte fraktionertes S6 gewonnen werden, wobei S6 a kein

Phosphat, b eins, c zwei, d drei, e vier und f fünf Phosphate enthält.

Alle S6-Derivate aus den drei unterschiedlichen Phosphorylierungsansätzen (in vivo phosphoryliertes, in vitro mit endogenen Proteinkinasen und in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertes S6) waren auf den angefärbten zweidimensionalen Gelen (Abb. 4A) gut zu erkennen, die Farbintensivität zeigte Unterschiede auf. Das unter in vivo Bedingungen phosphorylierte S6 war hochphosphoryliert: S6 d, e und f waren sehr stark mit Coomassie Brillant Blau angefärbt, S6 b am schwächsten, ebenso war der überwiegende Teil der Radioaktivität in d, e und f zu finden (Abb.4B). Die Farbintensivitäten der einzelnen S6-Derivate des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 waren gleich stark. Die Radioaktivitätsverteilung entsprach diesem Muster (Abb.6A). Die S6-Derivate c und d des in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertem S6 waren viel stärker mit Coomassie Brillant Blau angefärbt worden als e und f, ebenso war der überwiegende Teil der Radioaktivität in S6 c und d eingebaut worden (Abb.5, Tabelle 2).

Aus allen drei Phosphorylierungsansätzen wurde sowohl unfraktionertes als auch fraktioniertes S6 tryptisch gespalten und zunächst über eine Anionenaustauschersäule (2.4.) aufgetrennt.

Die Phosphopeptidmuster der DEAE-Trisacryl-Säulen aller Phosphorylierungsansätze ergaben, daß S6 mehr Phosphopeptide enthält, als man auf Grund der Anzahl an eingebauter Phosphatmoleküle erwarten würde; denn es ist bekannt, daß S6 b ein Phosphatmolekül enthält, aber das Phosphopeptidmuster von S6 b zeigt zwei Phosphopeptide, e und f sechs (Abb.10).

Die Phosphopeptidmuster der isoelektrischen Fokussierung unterstützen diese Ergebnisse der Anionenaustauscherchromatogramme. Bei S6 b treten wieder zwei Phosphopeptide auf, und die Aanzahl der Phosphopeptide nimmt bei S6 c enorm zu. Unfraktioniertes S6, das in vivo phosphoryliert wurde, besitzt nach dieser Trennmethode acht Phosphopeptide (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7, PP8); während unfraktioniertes S6, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wurde, sieben Phosphopeptide (PP2, PP3, PP5, PP6, PP7, PP8, PP9) besitzt. Schließlich beobachtet man bei unfraktioniertem S6, das in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert wurde, nur sechs Phosphopeptide (PP1, PP2, PP3, PP4, PP6 PP8). Die isoelektrischen Punkte der Phosphopeptide, die in allen drei Phosphorylierungsansätzen enthalten sind, stimmen überein. Drei Phosphopeptide des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6 fallen durch intensive radioaktive Markierung auf; PP7, PP8, PP9. Es ist anzunehmen, daß PP7 und PP8 auch in vivo durch die cAMP abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden, PP9 tritt bei der in vivo Phosphorylierung in der isoelektrischen Fokussierung nie auf. Durch endogene Proteinkinasen werden in vivo drei Phosphopeptide PP1, PP2, PP3 phosyphoryliert.

Die dritte angewandte, analytische Trennmethode der Phosphopeptide von S6 ist eine zweidimensionale "Fingerprintmethode", in der ersten Dimension erfolgt eine Elektrophorese und in der zweiten eine Chromatographie. Bei S6 beobachtet man wieder zwei Phosphopeptide, sowohl bei S6 b, das in vivo mit ^{32}P-Phosphat markiert worden war, als auch bei S6 b, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP

abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war. Bei S6 c steigt die Anzahl der Phosphopeptide gegenüber S6 b erheblich an (Abb.14 und 15).
Unfraktioniertes S6, das in vivo phosphoryliert wurde, zeigt zwölf Phosphopeptide, unfraktioniertes S6, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wurde, zeigt sechzehn Phosphopeptide.
Einige Phosphopeptide des in vitro phosphoryliertem S6, sowohl mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase als auch mit endogenen Proteinkinasen, sind mit Phosphopeptiden des in vivo phosphoryliertem S6 identisch. Zusätzliche Unterschiede treten in der Radioaktivitätsverteilung auf. Zwei stark radioaktiv markierte Phosphopeptide fallen bei S6 auf, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert worden war; eins davon fehlt auf dem Phosphopeptidmuster des in vivo phosphoryliertem S6, das andere enspricht Phosphopeptide I. Auf dem Phosphopeptidmuster des in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliertem S6 fallen zwei stark markierte Phosphopeptide auf (Abb.16A), sie sind identisch mit den Phosphopeptiden X und XII auf den Phosphopeptidmuster von in vivo phosphoryliertem S6.
Abschließend läßt sich feststellen, daß in vivo die cAMP abhängige Proteinkinase mit Sicherheit eine Stelle des S6 Proteins phosphoryliert, wahrscheinlich zwei. Endogene Proteinkinasen, die an den Ribosomen assoziiert sind übertragen auf zwei Serinreste Phosphatmoleküle.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. MATERIAL

Alle verwendeten, nachstehend nicht aufgeführten Substanzen wurden in p.a. Qualität von bekannten Firmen bezogen. Sämtliche Lösungen, die für Versuche mit Ribosomen benutzt wurden, waren steril angesetzt oder autoklaviert. Glasgeräte wurden autoklaviert.

Acrylamid von Bio-Rad, Richmond, Kalifornien, U.S.A.
Ammoniumperoxodisulfat von Serva, Heidelberg
^{32}P-γ-ATP, NEN, England
Cellulose-Platten, Cel 400, Macherey Nagel, Düren
Coomassie Brillant Blau, Serva, Heidelberg
Cycloheximid, Sigma, München
Cytochrom C, Sigma, München
DTT, Sigma, München
Folien für Isoelektrische Fokussierung, Servalyt Precotes 42974, Serva, Heidelberg
Joklik MEM, Flow Laboratories
^{32}P-Orthophosphat, Amersham Buchler, Braunschweig
Pankreatische Ribonuklease, Boehringer, Mannheim
Proteinkinase, catalytic subunit from Beef heart, Sigma, München
Proteinkinase, catalytic subunit aus Kaninchenherzen, persönliches Geschenk von Herrn Dr.V.Kinzel, DKFZ, Heidelberg
Proteinkinase-Inhibitor aus Kaninchenherzen angereichert nach der Methode von Gilman (37), persönliches Geschenk von Frau Dr.G.Schwoch, Max-Planck-Institut, Göttingen

Polyglutamat, Sigma, München
Puromycin, Sigma, München
Seren: Kälberserum, Seromed, München
Fötales Kälberserum, Boehringer, Mannheim
Pferdeserum, Boehringer, Mannheim
Spermin: Calbiochem
Trisacryl, LKB, München
Trypsin, TPCK (Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethyl-keton) behandelt, Worthington, Freehold, New Jersey, U.S.A.
Verstärkerfolien, Cronex Quanta III, Du Pont.

4.2. METHODEN

4.2.1. Anzucht von Zellen

Zwei transformierte Zellinien, menschliche HeLa-S3-Zellen und Myelom-Zellen der Maus (MPC-11) werden in Suspensionkulturen bei 37° C gehalten.
Das Nährmedium wird aus Trockenpulver angesetzt, mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und durch Membranfilter sterilisiert. Bis zum Gebrauch wird es bei 4° C gelagert.
Joklik modifizertes "Minimal Essential Medium" hat folgende Zusammensetzung (Angabe in mg/l):

NaCl	6 500	L-Threonin	48
KCL	400	L-Tryptophan	10
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	200	L-Tyrosin-Na	36
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	1 327	L-Valin	46
$NaHCO_3$	2 000	Cholinchlorid	1
Glucose	2 000	Folsäure	1
L-Arginin	105	i-Inosit	2
L-Cystin x 2 HCl	24	Nicotinamid	1
L-Glutamin	294	D-Ca-Pentothenat	1
L-Histidin	31	Pyridoxal x HCl	1
L-Isoleucin	52	Riboflavin	0,1
L-Leucin	52	Thiamin x HCl	1
L-Lysin	58	Phenolrot	10
L-Methionin	15	Streptomycin	50
L-Phenylalanin	32	Penicillin G	75 000 E

HeLa-Zellen sind Gebärmutterzellen, die im Jahre 1951 in Kultur genommen wurden. HeLa-Zellen wachsen in "Spinnerflaschen" unter ständigem Rühren. Die optimale Zelldichte vor Verdünnung liegt bei 7×10^5 Zellen/ml, die Verdopplungszeit beträgt ca. 30 h. Die Zellen werden täglich durch Mediumzugabe auf eine Dichte von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt. Das Medium enthält 7,5% Kälberserum (v/v).
MPC-11-Zellen (Mervin Plasma Cell Tumor-11) wurden 1970 von Mervin in Kultur genommen, sie produzieren Gammaglobulin. MPC-11-Zellen wachsen in Glasflaschen, die sich langsam auf Rollapparaturen um die Längsachse drehen. Die optimale Zelldichte vor Verdünnung liegt bei 1×10^6 Zellen/ml, die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 h. Täglich wird die Zellsuspension auf eine Dichte von 5×10^5 Zellen/ml verdünnt. Das Medium enthält 2% fötales Kälber- und 5,5% Pferdeserum (v/v).
Die Zellzahl wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alle Gefäße, die mit Zellen in Berührung kommen, sind autoklaviert, alle Arbeiten werden an einer sterilen Werkbank (Bio Gard Hood, The Baker Comp. Inc.,) ausgeführt.

4.2.1.1. ^{32}P-Orthophosphat-Markierung von Zellen in vivo

Zellen werden bei erhöhter Zelldichte (MPC-11-Zellen: 5×10^6 Zellen/ml, HeLa-Zellen: 3×10^6 Zellen/ml) in modifiziertem MEM-Medium, das kein Phosphat enthält, resuspendiert. Für 2 h werden die Zellen mit wenig Serum (MPC-11-Zellen in 2% fötales Kälberserum,

HeLa-Zellen in 5% Kälberserum) und mit 5,5 uCi/ml ^{32}P-Orthophosphat inkubiert. Anschließend wird die Serumkonzentration auf 15% erhöht und die Zellen 1 h lang bei 37° C weiterinkubiert.
Bei einigen Versuchen werden die Zellen 14 h vor der Erhöhung der Serumkonzentration auf eine radioaktive Konzentration von 2 µCi/ml gebracht. Für diese Versuche werden die Zellen in normaler Zelldichte in dem phosphatfreien Medium resuspendiert.

4.2.1.2. Hochsalzbehandlung der Zellen

Für einen Teil der Zellsuspension wird nach 2 h Inkubation im phosphatfreien Medium die Osmolarität durch Zugabe von NaCl um 280 mosmol für 15 min erhöht. Nach 15 min wird die Zellsuspension geteilt. Der eine Teil wird sofort aufgearbeitet, der andere Teil wird durch Zugabe von NaCl- und phosphatfreiem Medium auf isotone Bedingungen eingestellt, 30 min weiterinkubiert und dann aufgearbeitet.

4.2.2. Gewinnung eines postnuklearen Überstandes aus Zellen

Lösungen:

PBS-Puffer:
8 g NaCl
0,2g KCl
1,5g Na_2HPO_4 x 2 H_2O
0,2g KH_2PO_4
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
mit H_2O ad 1000 ml

RSB-Puffer:
10 mM Tris-HCl pH 7,4
10 mM KCl
1,5 mM $MgAc_2$

Durchführung:

Die Proteinsynthese der Kulturzellen wird durch Zugabe von Cycloheximid (50 µg/ml) oder durch schnelles Abkühlen bei den Osmolaritätsversuchen gestoppt.
Die folgenden Arbeiten werden auf Eis durchgeführt, die Lösungen haben eine Temperatur von 4° C.
Die Zellen werden 5 min bei 1000 U/min der Zentrifuge (RC-3B Sorvall) sedimendiert. Der Überstand wird dekantiert, die Zellen werden zweimal durch Resuspendieren in PBS-Puffer gewaschen. Danach werden die Zellen in RSB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Durch Zugabe von Triton x 100-Lösung wird die Endkonzentration auf 1% gebracht. Kerne und Zelltrümmer werden in einer Zentrifuge (Heraeus) 5 min bei 3 000 U/min sedimentiert. Anschließend wird der postnukleare Überstand dekantiert.

4.2.3. Isolierung der Ribosomen

Saccharose-Lösung:
2 M Saccharose
50 mM Tris-HCl pH 7,4
25 mM KCl
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

Der postnukleare Überstand wird vorsichtig auf die Saccharose-Lösung überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt mit einem Ti 60 Rotor in der Ultrazentrifuge (Beckman) 18 h bei 4° C und 40 000 U/min. Die Ribosomen-Niederschläge werden bei -20° C aufbewahrt. Die Überstände werden verworfen.

4.2.4. Trennung von Poly- und Monosomen

In einigen Versuchen sollten die mRNA-gebundenen von den mRNA-freien Ribosomen getrennt werden. Dieses wird durch eine Zentrifugation in Saccharose erreicht.

Lösung:
10% und 40% Saccharose (w/v)
50 mM Tris-HCl pH 7,4
25 mM KCL
10 mM $MgCl_2$
1 mM DTT

Durchführung:

Ein postnuklearer Überstand wird auf 10-40% Saccharose-Gradienten in 40 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend 5 h im SW 27 Rotor (Beckman) bei 25 000 U/min und 4° C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.
Die Gradienten werden von oben kontinuierlich mit einer peristaltischen Pumpe abgepumpt und mit einer Durchflußküvette bei 260 nm photometrisch verfolgt. Monosomen und Polysomen werden getrennt gesammelt und 28 h bei 40 000 U/min im Ti 60 Rotor zentrifugiert, die Mono- und Polysomen-Niederschläge werden bei -20° C aufbewahrt.

4.2.5. Dissoziation von Polysomen- und Monosomen in ribosomale Untereinheiten

Die mRNA-freien Monosomen werden durch hohe KCl-Konzentration in 40S- und 60S-Untereinheiten dissoziiert. Die mRNA-gebundenen Polysomen werden durch das Antibiotikum Puromycin und hohe KCl-Konzentration in ihre Untereinheiten dissoziiert. Puromycin bewirkt eine Ablösung der Peptidkette vom Ribosom, indem es als Analoges der Phenylalanin- bzw. Tyrosin-tRNA diese verdrängt und somit ist keine Peptidverknüpfung mehr möglich.

Lösungen:

Hochsalzpuffer:
50 mM Tris-HCl pH 7,4
500 mM KCl
10 mM $MgAc_2$
1 mM DTT

Puromycin-Release-Puffer:
50 mM Tris-HCl pH 7,4
500 mM KCl
2,5 mM $MgAc_2$
1 mM DTT

Verdünnungspuffer:
100 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM KCl
5 mM $MgAc_2$
1 mM DTT

Puromycin-Lösung:
10 mM Puromycin

Durchführung:

Alle Arbeiten werden bei 4° C durchgeführt. Alle Lösungen enthalten DTT zur Inhibierung der RNAsen.
Das Monosomenpellet wird im Hochsalzpuffer resuspendiert, die optische Dichte (OD), bei 260 nm bestimmt: Anschließend wird die Monosomen-Lösung auf 60 OD_{260}/ml gebracht und 1 ml auf einen 10-30% Hochsalzpuffer-Saccharose-Gradienten in 40 ml Zentrifugenröhrchen überschichtet. Zentrifugation erfolgt im SW 27 Rotor 6,5 h bei 25 000 U/min und 8° C.
Das Polysomenpellet wird im Puromycin-Release-Puffer resuspendiert und auch auf 60 OD_{260}/ml eingestellt. Danach werden 0,1 Vol Puromycin-Lösung und 0,1 Vol Verdünnungspuffer zupipettiert und für 10 min bei 37° C inkubiert. Dann erfolgt die Aufteilung auf Hochsalzpuffer-Saccharose-Gradienten wie bereits oben beschrieben.
Die Gradienten werden wieder von oben kontinuierlich abgepumpt und mit einer Durchflußküvette bei 260 nm verfolgt. Die 40S- und 60S-Untereinheiten werden getrennt gesammelt und im Ti 50 Rotor (Beckman) 18 h bei 40 000 U/min und 4° C sedimentiert. Die 40S- und 60S-Sedimente werden bei -20° C aufbewahrt, die Überstände verworfen.

4.2.6. Gewinnung aktiver Ribosomen aus der Gesamtpopulation

Nach Martin (44) lassen sich aktive Polysomen aus einer 80S-Fraktion durch Behandlung des postnuklearen Überstandes mit pankreatischer Ribonuklease gewinnen.

Durchführung:

Der postnukleare Überstand wird durch Zugabe von pankreatischer Ribonuklease auf eine Konzentration von 2 µg/ml gebracht und 3 min bei 4° C stehen gelassen. Anschließend werden 1/4 Vol an 2,5 M KCl zugegeben und der Ansatz auf 10-30% Hochsalz-Saccharose-Gradienten aufgeteilt. Die Zentrifugation erfolgt wie in 4.2.5. beschrieben.
Die drei Fraktionen 40S, 60S und 80S werden getrennt abzentrifugiert und die Sedimente bei -20° C aufbewahrt.

4.2.7. Isolierung von ribosomalen Proteinen

4.2.7.1. Hochsalzbehandlung von Ribosomen

Ribosomen, die wie unter 4.2.3. beschrieben isoliert wurden, werden vor der Extraktion der ribosomalen Proteine zusätzlich einer Hochsalzbehandlung unterzogen.
Ein Ribosomenpellet wird im Hochsalzpuffer resuspendiert, die optische Dichte bei 260 nm bestimmt und

die Lösung auf 100 OD_{260}/ml gebracht. Dann wird der Ansatz auf ein Saccharose-Kissen im Hochsalzpuffer (60% Saccharose, w/v) überschichtet. Zentrifugation erfolgt im Ti 50 Rotor 2 h bei 46 000 U/min und 4° C. Der Ribosomen-Niederschlag wird bei -20° C aufbewahrt und der Überstand verworfen.

4.2.7.2. RNA-Extraktion

Die Ribosomensedimente (bzw. 40S-, 60S- und 80S-Sedimente) werden in 20 mM Tris-HCl pH 7,4 resuspendiert, die OD bei 260 nm bestimmt und der Ansatz auf 100 OD_{260}/ml gebracht. Danach wird die $MgAc_2$-Konzentration auf 200 mM eingestellt und 2 Vol Essigsäure zupipettiert. Der Ansatz wird für 10 min auf Eis stehen gelassen. Dann erfolgt die Sedimentation der RNA in einem JS 13 Rotor (Beckman) für 30 min bei 9 000 U/min und 4° C. Der Überstand enthält die ribosomalen Proteine. Daraus werden zwei Aliquots (5µl und 10 µl) zur Proteinbestimmung entnommen.

4.2.7.3. Acetonfällung ribosomaler Proteine

Die gelösten ribosomalen Proteine werden mit 5 Vol gekühltem Aceton 2 h bei 4° C präzipitiert. Die Proteine werden 20 min bei 9 000 U/min und 4° C im JS 13 Rotor in einer Beckman J 21 C-Zentifuge sedimentiert, getrocknet und bei -20° C aufbewahrt.

4.2.7.4. Lyophylisation ribosomaler Proteine

Die gelösten ribosomalen Proteine werden in einem Dialyseschlauch (Visking, Reichelt Chemie Technik) 3 h bei 4° C gegen autoklaviertes Wasser dialysiert. Anschließend wird die dialysierte Proteinlösung lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Proteingemisch wird bei -20° C aufbewahrt.

4.2.8. Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der extrahierten ribosomalen Proteine erfolgte nach der Methode von Hartree (45).

Lösung A:
2 g Kalium-Natriumtartrat, 100 g Na_2CO_3 werden in 500 ml NaOH gelöst und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Lösung B:
2 g Kalium-Natriumtartrat, 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O werden in 90 ml Wasser gelöst und 10 ml N NaOH zugegeben.

Lösung C (wird jeweils frisch hergestellt):
1 Volumenteil Folin-Ciocalteus-Reagenz wird mit 15 Volumenteilen gemischt.

Durchführung:

Die Bestimmung erfolgt parallel zu einer doppelten Standardreihe aus Rinderserumalbumin (5-50 µg).
Proben und Standardmengen werden in je 200 µl Wasser aufgenommen, mit 180 µl Lösung A versetzt, gemischt und bei 50° C im Wasserbad 10 min erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden je 20 µl Lösung B zugegeben, gemischt und 10 min stehen gelassen. Unter kräftigem Mischen werden jeweils 600 µl Lösung C hinzupipettiert, anschließend wird wieder bei 50° C 10 min erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Extinktion bei 650 nm Wellenlänge im Photometer (Zeiss PM Q 11) gemessen.

4.2.9. $^{32}\gamma$ - ATP-Markierung von Ribosomen und ribosomalen Proteinen in vitro mit Proteinkinasen

Die in vitro Phosphorylierungsansätze werden, wie von Nielsen (15) und Wettenhall (28) beschrieben, durchgeführt.

Puffer:
50 mM Tris- Hcl pH 7,4
0,4 mM EGTA
10 mM $MgCl_2$

Saccharose-Lösung:

1	M Saccharose
20	mM Tris-HCl pH 7,4
100	mM KCl
5	mM $MgCl_2$
0,1	mM EGTA
1	mM DTT

Proteinkinase:
Katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase aus Kaninchenherzen, ein persönliches Geschenk von Dr. Kinzel, Heidelberg, oder die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase von Sigma aus Rinderherzen.

Durchführung der in vitro Phosphorylierungsansätze:

a) Mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase.
Für diese Versuche werden hochsalzbehandelte Ribosomen eingesetzt. Die Ribosomen oder ribosomale Proteine werden in dem oben angegebenen Puffer resuspendiert, die optische Dichte der Ribosomen wird im Photometer bestimmt. Für einen Ansatz werden entweder 5 OD_{260} Ribosomen oder 200 µg ribosomale Proteine eingesetzt, 48 Einheiten der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase werden zupipettiert, schließlich wird die Reaktion mit 9,6 uCi ^{32}P-γ-ATP gestartet. Der Ansatz wird für 30 min auf 30° C erwärmt.
Die Ansätze werden unterschiedlich weiterbehandelt:
sind Ribosomen als Substrat eingesetzt, wird der Ansatz auf die Saccharose-Lösung überschichtet und 18 h

bei 43 000 U/min und 4° C im Ti 50 Rotor zentrifugiert. Anschließend erfolgt RNA-Extraktion.
Sind ribosomale Proteine als Substrat eingesetzt, werden diese mit 10% TCA präzipitiert. Die Proteine werden 30 min bei 9 000 U/min und 4° C im JS 13 Rotor sedimentiert, anschließend noch zweimal gewaschen.
Zur Inhibierung der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase werden folgende Inhibitoren eingesetzt:
1. Angereicherter Inhibitor nach Gilman, ein persönliches Geschenk von Frau Dr. Schwoch, Göttingen. Der Inhibitor ist spezifisch für cAMP abhängige Proteinkinasen und wurde nach der Methode von Gilman (37) aus Kaninchenherzen isoliert (im Ansatz: 10 µl).
2. Spermin (im Ansatz: 0.5 mM)
3. Polyglutamat (im Ansatz: 50 µg/ml)

b) Mit endogenen Proteinkinasen
Für diese Versuche werden keine hochsalzbehandelte Ribosomen eingesetzt. Die Ribosomen werden wie bereits angegeben im Puffer resuspendiert und mit 19,2 µCi inkubiert. Die Reaktion wird wie für die exogene Phosphorylierung beschrieben durchgeführt.

4.2.10. Auftrennung ribosomaler Proteine durch Gelelektrophorese

4.2.10.1. Eindimensionale Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophorese wird mit dem diskontinuierlichen Puffersystem von Laemmli (46) durchgeführt. Die Polyacrylamidkonzentration beträgt 12-18%.

Stammlösungen:

1 30% Acrylamid (w/v)
0,8% Bisacrylamid (w/v)
2 1 M Tris-HCl pH 6,8 (für Sammelgel)
3 3 M Tris-HCl ph 8,9 (für Tenngel)
4 10% SDS (w/v)
5 60% Sucrose (w/v)

Polymerisationskatalysatoren:

6 TEMED
7 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

Daraus werden Sammel- und Trennngel bereitet (Beispiel für ein 15 mm dickes Gel):

Sammelgel:

1	ml Stammlösung	1
1,25	ml "	2
7,64	ml H_2O	
100	µl Stammlösung	4
5	µl "	6
50	µl "	7

12% ige Trenngellösung:

8	ml Stammlösung	1
2,5	ml "	3
9,3	ml H_2O	
200	µl Stammlösung	4
10	µl "	6
25	µl "	7

18% ige Trenngellösung:

12	ml	Stammlösung	1
2,5	ml	"	3
1,3	ml	H_2O	
4	ml	Stammlösung	5
200	µl	"	4
10	µl	"	6
25	µl	"	7

Probenpuffer:

125 mM	Tris-HCL pH 6,8
2%	SDS (w/v)
0,001%	Bromphenolblau (w/v)
10%	Glycerol (v/v)
5%	2-Mercaptoethanol (v/v)

Elektrodenpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1%	SDS

Durchführung:

Das fertige Trenngel hat 19 cm Höhe und 15 cm Breite. SDS und die Polymerisationskatalysatoren werden erst nach 10 min Entgasen hinzugefügt, danach werden die beiden Trenngellösungen in eine Gradientenmischapparatur gegossen und über eine Pumpe (Avimed) zwischen die beiden Glasplatten gebracht. Anschließend wird

mit 400 µl H_2O überschichtet um eine plane Oberfläche des Trenngels zu erhalten. Nach Auspolymerisieren des Trenngels (30 min) wird das Wasser dekantiert und entgaste Sammelgellösung eingefüllt. Sofort nach Gießen der Sammelgellösung wird ein Teflonkamm zur Formung der Probenkammern zwischen die Glasplatten geschoben.
Nach Festwerden des Sammelgels (30 min) wird das Gel im Gelelektrophoreseapparat befestigt, mit 2 l Elektrodenpuffer beschickt, der Kamm entfernt und die Proben mit einer Mikroliterspritze auf den Grund der Probenkammern geladen. Die Proteinproben sind im Probenpuffer gelöst, kurz vor Gebrauch wird die Konzentration von 2-Mercaptoethanol auf 5% gebracht und 10 min bei 96° C erhitzt.
Die Elektrophorese erfolgt mit konstantem Strom von 15 mA (bei 10 mm Geldicke mit 10 mA) und einer Maximalspannung von 300 V. Sie wird beendet, wenn der Indikatorfarbstoff Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hat (ca. 11 h).

4.2.10.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Kaltschmidt und Wittman (47) entwickelten ein zweidimensionales Gelsystem für ribosomale Proteine, das von Lastick und McConkey (33) speziell für ribosomale Proteine variiert wurde.
Die Proteine werden in der ersten Dimension in Rundgelen unter den Bedingungen eines hohen pH-Wertes (8,6) und niedriger Acrylamidkonzentration (4%), in der zweiten Dimension in Flachgelen bei niedrigem pH (4,6) und hoher Acrylamidkonzentration (15%) aufge-

trennt. Gemeinsam ist in beiden Dimensionen die Anwesenheit von 6 M Harnstoff zur Denaturierung der Proteine.

1. Dimension

Gellösung:

6	M	Harnstoff
0,2	M	Tris
0,01	M	EDTA
0,26	M	Borsäure
4%		Acrylamid (w/v)
0,13%		Bisacrylamid (w/v)

Polymerisationskatalysatoren:

1.	TEMED
2.	10 & Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

Probenpuffer:

8	M	Harnstoff
0,02	M	Tris
1	mM	EDTA
0,026	M	Borsäure
5%		2-Mercaptoethanol (v/v)

Überschichtungspuffer:

6	M	Harnstoff
0,002	M	Tris
1	mM	EDTA
0,026	M	Borsäure

Elektrodenpuffer:
0,06 M Tris
0,078 M Borsäure
3 mM EDTA

Der Elektrodenpuffer wird mit NaOH auf pH 8,6 eingestellt.

Durchführung:

Glasröhrchen von 15 cm Länge und 3,4 mm Durchmesser werden an einem Ende mit Kunststoffilm abgedichtet. Die Gellösung wird 10 min entgast, pro 10 ml mit 5 µl TEMED und 40 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat versetzt und in die Glasröhrchen bis zu einer Höhe von 12,5 cm gefüllt, anschließend mit 20 µl H_2O überschichtet. Die Polymerisationzeit beträgt ca. 30 min.
Das zu trennende Proteingemisch wird im Probenpuffer gelöst (10mg Protein/ml), mit 2- Mercaptoethanol versetzt (5% v/v Endkonz.) und 10 min bei 65° C erwärmt. Die Glasröhrchen werden in den Elektrophoreseapparat (H. Hölzel, Dorfen) eingehängt. Pro Röhrchen werden 50 µl Probenlösung (entsprechend 500 µg) mit einer Pipette auf das Gel geladen und 50 µl Überschichtungspuffer darübergelegt; dann wird mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Pufferkammern werden mit 1 l Elektrodenpuffer beschickt. Die Proteine wandern zur Kathode, die angelegte Spannung beträgt 100 V. Die Elektrophorese wird durch den Lauf des Indikatorproteins Cytochrom C, das in einem getrennten Röhrchen aufgetragen ist, verfolgt. Wenn der Farbstoff das untere Ende erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet (nach ca. 26 h). Die Gele werden entweder sofort dem zweiten Elektrophoreseschritt unterzogen oder bei -20° C eingefroren.

2. Dimension:

Gellösung:

6	M	Harnstoff
0,44	M	Essigsäure
0,025	M	KOH
15%		Acrylamid (w/v)
0,47%		Bisacrylamid (w/v)

Elektrodenpuffer:

0,093	M	Glycin
0,013	M	Essigsäure

Äquilibrierungspuffer:

6	M	Harnstoff
0,35	M	Essigsäure

Indikatorfarbstofflösung:

0,02%	Pyronin G (w/v)
40%	Glycerol (v/v)

Durchführung:

Die Elektrophorese in der zweiten Dimension erfolgt nach Studier (48). Das Rundgel wird 10 min in 10 ml Äquilibrierungslösung, die 2,5% 2-Mercaptoethanol (v/v) enthält, auf dem Schwenkapparat gespült, anschließend noch einmal 2 min in 10 ml der gleichen Lösung ohne 2-Mercaptoethanol. Danach wird das Rundgel horizontal, 20 cm vom unterem Rand entfernt und zwischen zwei Glasplatten geklemmt. Die Glasplatten haben eine Länge von 25 cm und eine Breite von 20 cm. 60 ml Gellösung werden 10 min entgast, mit 300 µl

TEMED und 150 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat versetzt, dann bis 1 cm unter das Rundgel in die Flachgelkammer gegossen, mit 400 µl H_2O überschichtet und 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird das Wasser wieder entfernt und zu 10 ml entgaste Gellösung werden 100 µl TEMED und 33 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat pipettiert und diese bis zu einer Höhe von 2 cm über dem Rundgel in die Kammer gefüllt. Es wird wieder mit 400 µl H_2O überschichtet und das Gel 2 h stehen gelassen.
Das polymerisierte Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, und diese mit 2 l Elektrodenpuffer gefüllt; über das Gel werden 50 µl Indikatorlösung gegeben.
Die Proteine wandern zur Kathode, die angelegte Spannung beträgt 300 V, der Strom wird auf 16 mA limitiert. Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbstoff den unteren Gelrand erreicht hat (nach ca. 24 h).

4.2.11 Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brillant Blau.

Nach der Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Gel durch Anfärben mit Coomassie Brillant Blau sichtbar gemacht.

Färbelösung:

0,1%	Coomassie Brillant Blau (w/v)
10%	Essigsäure (v/v)
40%	Methanol (v/v)

Entfärbelösung:

10%	Essigsäure (v/v)
40%	Methanol (v/v)

Durchführung:

Das Gel wird mindestens 1 h lang auf einem Schwenkapparat bei 37° C bewegt. Die Entfärbung der proteinfreien Gelbereiche erfolgt anschließend durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung.

4.2.12 Fluorographie von radioaktivem Protein in Polyacrylamidgelen

Das Gel wird auf Filterpapier gelegt und 2 h auf einem Geltrocknungsapparat (Hoefer Scientifics Instruments) unter Vakuum bei 80° C getrocknet. Danach wird es in eine Kassette mit einem Röntgenfilm (Kodak XAR-5) und einer Verstärkerfolie (Du Pont Quanta III) zur Verstärkung der ^{32}P-markierten Proteine belegt.

4.2.13 Messung radioaktiver Proben

Bei ^{32}P-markierten Proben erfolgt die Radioaktivitätsbestimmung durch Cerenkovzählung im Flüssigkeitsspektrometer (Packard Tri-Carb B 2450 oder B 2660).

4.2.14 Elution von S6 aus Polyacrylamidgelen

Nach Anfärben der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine und Erstellen eines Autoradiogramms wird S6 mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel geschnitten und die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer bestimmt.
Aus einem eindimensionalen Gel läßt sich S6 als eine Bande ausschneiden, aus einem zweidimensionalen Gel lassen sich die einzelnen Derivate von S6 (a, b, c, d, e, f) ausschneiden.

4.2.15 Spaltung von S6 in Polyacrylamidgelen mit Trypsin

Lösungen:
50 mM Triethylammoniumbicarbonat pH 8,5 und
Trypsin (10 mg/ml) in 1 mM HCl gelöst

Die ausgeschnittenen S6-Gelstücke werden zunächst in Wasser gespült, das mehrmals gewechselt wird, danach werden die Gelstücke mit Triethylammoniumbicarbonatlösung äquilibriert.
Die Gelstücke werden in Glasspitzröhrchen überführt, mit einem Spatel zerkleinert, je nach Größe werden 500 bis 1 500 µl Triethylammoniumbicarbonatlösung, Trypsin (30 µg/ml) und ein kleiner Magnet zugegeben. 14 h wird die Suspension bei 37° C auf einem Magnetrührer gerührt. Danach werden die Gelstücke in einer Labofuge bei 1 000 U/min 5 lang abzentrifugiert. Der Überstand enthält die gelösten Phosphopeptide, falls

noch Gelstücke enthalten sind wird nochmals in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Sowohl von dem Überstand als auch von den sedimentierten Gelstücken wird die Radioaktivität bestimmt.
Folgt eine Auftrennung der Phosphopeptide über Dünnschichtelektrophorese werden diese lyophilisiert; erfolgt die Auftrennung über eine DEAE-Trisacryl-Säule entfällt die Lyophylisation. Für die Phosphoaminosäurebestimmung werden Aliquots (à 400 cpm) entnommen.

4.2.16. Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide

4.2.16.1. DEAE-Trisacryl-Säule

Die tryptischen Phosphopeptide werden über eine Anionenaustauschersäule aufgetrennt.

Lösungen:
A: 50 mM Triethylammoniumbicarbonat pH 8,5
B: 400 mM Triethylammoniumbicarbonat pH 8,5

Durchführung:

Auf eine mit Lösung A vorbehandelte Säule (1 x 30 cm) werden die aufzutrennenden Phosphopeptide, die vorher mit Wasser 1:1 verdünnt wurden, aufgetragen. Danach wird die Säule mit 10 ml Lösung A gewaschen, anschließend wird mit Hilfe eines linearen Gradienten (je 150 ml Lösung A und B) eluiert. Es werden

Fraktionen a 1 ml gesammelt, zur Detektion des radioaktiven Materials werden diese im Szintillationsspektrometer gemessen. Die Fraktionen, welche radioaktives Material enthalten, werden lyophilisiert und zum Teil durch Dünnschichtelektrophorese nochmals aufgetrennt.

4.2.16.2. Dünnschichtelektrophorese und Chromatographie

Eine alternative Methode zur Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide ist die Dünnschichtelektrophorese mit anschließender Chromatographie nach Traugh et al. (49). Die tryptischen Phosphopeptide werden zweidimensional aufgetrennt: in der ersten Dimension durch eine Elektrophorese bei pH 3,5: in der zweiten Dimension durch eine Chromatographie.

1. Dimension:

Trägermaterial: Cellulose-Platten, Cel 400 (Macherey/ Nagel)
Puffer: Essigsäure / Pyridin / Wasser (100: 10: 890; v/ v/ v) pH 3,5
Marker: Methylgrün (grün), Xylencyanol FF (blau), Säurefuchsin (rot), Orange G (gelb)

Durchführung:

Die lyophilisierten tryptischen Phosphopeptide werden in 10 µl H_2O gelöst und auf die Cellulose-Platte aufgetragen. Vor dem Elektrophoreselauf wird in Höhe der Probe der Marker aufgetragen, die Phosphopeptide wandern zur Kathode. Es wird eine Spannung von 400 V für 3 h angelegt. Als Elektrophoreseapparat wird ein konstruiertes Gerät mit Plexiglasgehäuse und thermostatisierbarer, epoxidbeschichteter Kühlplatte aus Aluminium benutzt. Nach dem Elektrophoreselauf wird die Cellulose-Platte bei 50° C getrocknet.

2. Dimension:

Laufmittel: nButanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (60: 40: 12: 48; v/ v/ v/ v)

Durchführung:

Die getrocknete Cellulose-Platte wird in einen Chromatographieglastrog gestellt. Kurz bevor das Laufmittel den oberen Rand der Cellulose-Platte erreicht hat, wird diese herausgenommen und bei 50° C getrocknet. Anschließend wird die Cellulose-Platte mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie zur Lokalisation des radioaktiven Materials belegt.

Zum Vergleich werden Dünnschichtelektrophoresen nach Martin-Pérez und Thomas (42) durchgeführt. Die erste Dimension erfolgt bei pH 1,5, die zweite bei pH 3,5. Die angelegte Spannung beträgt bei beiden 500 V für 3 h.

Puffer für die erste Dimension:
Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (75: 25: 400; v/ v/ v)

Puffer für die zweite Dimension:
Essigsäure/Pyridin/Wasser (50: 5: 445; v/ v/ v)

In beiden Dimensionen wandern die Phosphopeptide zur Kathode.

4.2.16.3. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung trennt Proteine und Peptide nach ihrem isoelekterischen Punkt (IP). Der IP zeichnet sich dadurch aus, daß bei einem bestimmten pH die Zahl der positiven und negativen Ladungen des Proteins genau gleich ist.
Gelöste Proteine bilden polyvalente Ionen. Die negativen Ladungen rühren von den Carboxy-Gruppen der Glutaminsäure- und Asparaginsäureresten und von dem Carboxy-Ende der Peptidkette her. Die positiven Ladungen werden von den basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin sowie von der aminoendständigen Aminosäure geliefert. Der Ladungszustand dieser sauren und basischen Gruppen hängt vom pH ab; niedriger pH drängt die Dissoziation der sauren Gruppen zurück, bei hohem pH sind die basischen Gruppen ungeladen.

Anodenpuffer:
0,83 g L-Asparaginsäure
0,92 g L-Glutaminsäure
ad 250 ml Wasser

Kathodenpuffer:

30 ml Äthylendiamin
1,09 g L-Arginin
0,91 g L-Lysin
ad 250 ml Wasser

Durchführung:

Die tryptischen Phosphopeptide werden mehrmals lyophilisiert und dann so in H_2O gelöst, daß ein Aliquot von 5 ul ca. 500 cpm enthält. Für die isoelektrische Fokussierung werden Fertigfolien (Servalyt Precotes 42974) benutzt. 5 µl werden pro Tasche mit einer Pipette aufgetragen. Ein mit ^{14}C-markiertes Proteingemisch (BDH CFA 689) und mehere Eichkits (Pharmacia) unterschiedlicher pH-Bereiche werden mit aufgetragen.
Der Strom wird für 2 h auf 5 mA limitiert, die angelegte Spannung beträgt nach ca. 20 min 1700 V. Nach dieser Zeit wird die Folie vorsichtig von der Kühlplatte abgehoben und mit einer Schere wird der Teil mit den radioaktiv markierten Proben von dem Teil mit den nicht radioaktiv markierten Eichkits getrennt.
Der radioaktiv markierte Teil wird sofort bei 50° C 30 min lang getrocknet und danach mit einer Verstärkerfolie und einem Röntgenfilm belegt. Der Teil,

auf dem die Eichkits aufgetragen sind, wird für 10 min mit 10% TCA fixiert und anscließend mit Coomassie Brillant Blau, wie unter 4.2. 11.beschrieben, angefärbt.

4.2.17. Elution von tryptischen Phosphopeptiden aus DünnschichtCellulose-Platten

Mit Hilfe eines Fluorogramms lassen sich die tryptischen Phosphopeptide auf der Cellulose-Platte lokalisieren. Diese werden mit einem Spatel ausgekratzt und in Tri-Carb-Röhrchen überführt. Anschließend wird die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer durch Cerenkovzählung bestimmt.

4.2.18. Phosphoaminosäurebestimmung

Phosphoaminosäurelösungen:
Phosphoserin 10 mg/ ml
Phosphothreonin 10 mg/ ml
Phosphotyrosin 10 mg/ ml

Puffer: Ameisensäure/ Essigsäure/ Wasser
(22,5: 78: 899,5; v/ v/ v) pH 1,9

Ninhydrinlösung:
900 mg Ninhydrin
15 ml Collidin
30 ml Essigsäure
ad 285 ml H_2O mit nButanol gesättigt

Trägermaterial: Cellulose-Platten wie in 4.2.16.2. beschrieben.

Durchführung:

Die lyophilisierten Proben (Aliquots tryptischer Phosphopeptide, ca. 400 cpm) werden in 100 µl 6 M HCL gelöst und in Hydrolyseröhrchen (Pierce) überführt. Anschließend werden diese unter Vakuum 3 h bei 110° C erwärmt. Nach der Hydrolyse werden die Proben lyophilisiert, in je 15 µl Phosphoaminosäurelösung resuspendiert und auf eine Dünnschicht-Cellulose-Platte aufgetragen. Die angelegte Spannung beträgt 500 V für 90 min, das aufzutrennende Material wandert zur Anode. Anschließend wird die Platte bei 50° C getrocknet und mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie belegt. Zur Identifizierung der nicht radioaktiven Phosphoaminosäuren wird die Cellulose-Platte mit der Ninhydrinlösung besprüht.

5. DISKUSSION

Das ribosomale Protein S6 der 40S-Untereinheit kann sich aus maximal sechs Derivaten (S6 a-f), welche durch zweidimensionale Gelelektrophorese getrennt werden können, zusammensetzen. Wenn die Proteinsynthesserate hoch ist, sind alle sechs Derivate zu erkennen; wenn die Proteinsynthesserate niedrig ist, sind nur S6 a und b zuerkennen (50). In Polysomen, die an der Proteinsynthese beteiligt sind, findet man viel hochphosphoryliertes S6, das fünf Phosphatmoleküle aufgenommen hat; wobei S6 a kein Phosphat, S6 b eins, S6 c zwei, S6 d drei, S6 e vier und S6 f fünf Phosphate besitzen.

Diese vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zu der Frage, welche Proteinkinasen an der S6 Phosphorylierung beteiligt sind. Die S6 Phosphorylierung wurde durch drei unterschiedliche Phosphorylierungsbedingungen studiert:

1. in vivo Phosphorylierung von HeLa- und MPC-11-Zellen; die Proteinsynthese wurde mit Serum stimuliert.
2. in vitro Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase von 80S Ribosomen, 40S-Untereinheit und extrahierten ribosomalen Proteinen.
3. in vitro Phosphorylierung mit endogenen, am Ribosom assoziierte, Proteinkinasen von 80S Ribosomen.

Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten die S6-Derivate fraktioniert gewonnen werden. Fraktionierte S6-Derivate als auch unfraktioniertes S6 wurden tryptisch gespalten und die tryptischen Phosphopeptide durch vier Methoden analysiert:

1. Zweidimensionale Auftrennung durch Elektrophorese und Chromatographie
2. Zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese
3. Isoelektrische Fokussierung
4. Anionenaustauschersäule

Mehrere Trennmethoden wurden angewandt, um die Ergebnisse mit denen, die in der Literatur bereits beschrieben wurden, vergleichen zu können.

Nach in vivo Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins von Hela- und MPC-11-Zellen konnten zwölf radioaktiv markierte tryptische Phosphopeptide (I bis XII) durch zweidimensionale Auftrennung (1. Dimension: Dünnschichtelektrophorese, 2. Dimension: Dünnschichtchromatographie) nachgewiesen werden. Nach in vitro Phosphorylierung von 80S Ribosomen und 40S-Untereinheiten, die aus HeLa- und MPC-11-Zellen isoliert worden waren, mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase wurden noch zusätzliche, radioaktiv markierte, tryptische Phosphopeptide gefunden. Vier Phosphopeptide der beiden Phosphorylierungsstudien zeigen identische Wanderungseigenschaften auf der Dünnschicht: I, IV, VI und VIII (Abb.14).

Tryptische Spaltung des reinen Derivats S6 b aus beiden Phosphorylierungsansätzen ergibt nach zweidimensionaler Auftrennung jeweils zwei Phosphopeptide; bei in vivo phosphoryliertem S6 b sind es I und II. Das Phosphopeptid I tritt auch nach der in vitro Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase auf.

Martin-Pérez und Thomas (42) führten ebenfalls eine Analyse von tryptischen Phosphopeptiden einzelner S6-Derivate durch, die sie aus 3T3-Zellen (Maus) gewon-

nen hatten. Die Zellen wurden in vivo mit ^{32}P-Orthophosphat inkubiert und zehn Minuten lang mit Serum stimuliert. In ihrem speziellen Trennsystem, zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese, fanden sie bei S6 b zwei Phosphopeptide, S6 b aus Hela-Zellen ergab ebenfalls zwei Phosphopeptide (Abb.20). Bei den höher phosphorylierten S6-Derivaten zeigten sich Unterschiede in den Phosphopeptidmustern. Martin-Pérez und Thomas kamen aufgrund der Phosphopeptidmuster einzelner S6-Derivate zu dem Schluß, daß nach Serumstimulation der 3T3-Zellen die Phosphatgruppen nacn einer spezifischen Reihenfolge auf bestimmte Serinreste des S6 Proteins übertagen werden. Sie beobachteten bei S6 b zwie Phosphopeptide, bei S6 c kommen drei, bei S6 d zwei und bei S6 e und f kommen nochmal vier Phosphopeptide dazu. Diese zunehmende Anzahl der Phosphopeptide der jeweils höher phosphorylierten S6-Derivate nach Serumstimulation entsprach nie meinen Ergebnissen. Wie oben bereits erwähnt sind unter in vivo Bedingungen bei S6 b aus Hela- und MPC-11-Zellen zwei Phosphopeptide zu sehen, das Phosphopeptidmuster von S6 c ist in meinen Analysen identisch mit dem Phosphopeptidmuster von unfraktioniertem S6; d.h. bei S6 c sind bereits alle zwölf Phosphopeptide (I bis XII) vertreten.

Die tryptischen Phosphopeptide von einzelnen S6-Derivaten wurden von mir zusätzlich durch zwei weitere Trennmethoden untersucht, Anionenaustauschersäule (s. Kapitel 2.4.) und Isoelektrische Fokussierung (s. Kapitel 2.5.). Beide Methoden bestättigten das Ergebnis, daß die Anzahl der Phosphopeptide von S6 c gegenüber S6 b stark zunimmt und nicht nur drei Phosphopeptide zusätzlich auftreten, wie es von Martin-Pérez und Thomas beschrieben wurde.

Bei der zweidimensionalen Auftrennung der tryptischen Phosphopeptide von in vivo phosphoryliertem S6 e und f, traten experimentelle Schwierigkeiten auf. Diese Phosphopeptide lösten sich sehr schwer in dem sauren Elektrophoresepuffer. Nach Auftragen auf die Dünnschichtcelluloseplatte blieben die Phosphopeptide am Auftragungspunkt größten Teils liegen. Dieses Problem konnte bisher nicht gelöst werden, bei den beiden anderen angewandten analytischen Methoden trat dieses Löslichkeitsproblem nicht auf.

Erstaunlich ist die große Zahl der beobachteten Phosphopeptide, da ein einzelnes S6-Molekül maximal fünf Phosphatmoleküle aufnehmen kann. Eine ribosomale 40S-Untereinheit enthält 1 Mol S6 (51), demnach würde man maximal fünf Phosphopeptide erwarten. Ein Grund für die große Zahl an Phosphopeptiden könnte sein, daß unterschiedliche 40S-Untereinheiten unterschiedlich phosphorylierte S6 Moleküle besitzen, das wiederum würde bedeuten, auf den S6 Molekülen sind mehrere Phosphatbindungsstellen (eventuell zwölf) vorhanden und nur fünf Stellen können jeweils maximal besetzt werden. Ein anderer Grund für die Vielzahl an Phosphopeptiden könnte darin bestehen, daß einige Phosphopeptide dieselben Phosphorylierungsstellen enthalten, jedoch die tryptische Spaltung aufgrund der Phosphatgruppen fehlerhaft ist, sodaß Peptide mit überlappenden Aminosäuresequenzen entstehen, die sich in der zweidimensionalen Auftrennung darstellen. Eine Entscheidung zwischen den beiden diskutierten Möglichkeiten für die Entstehung der S6 Phosphopeptidmuster kann erst nach Aufklärung der Aminosäuresequenz getroffen werden.

In einer dritten in vitro Phosphorylierungsstudie von S6 wurden Ribosomen, deren assoziierte Proteine nicht durch Hochsalzbehandlung abgetrennt worden waren, mit radioaktivem ^{32}P- γ - ATP inkubiert. Das tryptische Phosphopeptidmuster, das durch zweidimensionale Auftrennung erhalten wurde, unterschied sich sehr stark von den beiden oben erwähnten Auftrennungen (s. Kapitel 2.7.). Vergleicht man dieses in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphorylierte tryptische Phosphopeptidmuster mit dem unter in vivo Bedingungen phosphoryliertem fällt auf, daß zwei Phosphopeptide in beiden Auftrennungen identisch sind: X und XII. Vergleicht man die beiden unter in vitro Bedingungen phosphorylierten (mit endogenen Proteinkinasen und mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase) Phosphopeptidmuster fallen keine identischen Phosphopeptide auf. Daraus lassen sich zwei Schlüsse ziehen:

1. An 80S Ribosomen sind keine cAMP abhängigen Proteinkinasen assoziiert.
2. An der S6 Phosphorylierung sind mehrere Proteinkinasen beteiligt.

Die tryptischen Phosphopeptide von allen drei Phosphorylierungsbedingungen wurden durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt (Tabelle 4). Vergleicht man die drei tryptischen Phosphopeptidmuster fällt auf, daß fast alle Phosphopeptide, die in vitro phosphoryliert wurden, auch bei in vivo phosphoryliertem S6 vorhanden sind; nur PP9 von S6, das in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliert wurde, tritt bei in vivo phosphoryliertem S6 nie auf. Auf dem Phosphopeptidmuster des in vitro mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase phosphoryliertem S6

fallen zwei stark radioaktiv markierte Phosphopeptidbanden ins Auge: PP8 (IP 6,4) und PP9 (IP 9,3). Außerdem ist noch PP7 (IP 5,7) zu erwähnen, das etwas schwächer aber deutlich stärker als die übrigen ist.

Wettenhall und Morgan fanden bei der in vitro S6 Phosphorylierung mit der katalytischen Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase drei Phosphorylierungsstellen (38), sie bestimmten die Aminosäuresequenz der cAMP abhängigen Phosphorylierungsstellen aus Rattenleber S6: Arg Arg Leu Ser Ser Leu Arg Ala Ser Thr Ser Lys Ser Glu Glu Ser Gln Lys. Nach ihren Beobachtungen werden die ersten drei Serine durch die cAMP abhängige Proteinkinase in vitro phosphoryliert, auf das erste Serin wird bevorzugt Phosphat übertragen.

Bei der isoelektrischen Fokussierung der tryptischen Phosphopeptide aus S6, das in vitro mit endogenen Proteinkinasen phosphoryliert worden war, fallen zwei stärker radioaktiv markierte Phosphopeptidbanden mit sauren isoelektrischen Punkten auf: PP1 (IP 3,5) und PP2 (IP 3,7). PP1, PP2, PP7 und PP8 sind bei der isoelektrischen Fokussierung des in vivo phosphoryliertem S6 auch vorhanden, insgesamt sind acht tryptische Phosphopeptide bei in vivo phosphoryliertem unfraktioniertem S6 zu erkennen. Zwei Serinreste des S6 Proteins, sowohl aus Hela- als auch aus MPC-11-Zellen, werden durch die cAMP abhängige Proteinkinase und höchstwahrscheinlich zwei weitere Serinreste durch eine endogene Proteinkinase, die an die Ribosomen assoziiert ist, phosphoryliert. Für die anderen Phosphorylierungsstellen müssen zusätzliche Proteinkinasen verantwortlich sein; eine Vermutung, die auch von anderen Autoren (10,12,52,53) ausgesprochen wurde.

Die S6 Phosphorylierung wurde unter in vivo Bedingungen nach Zugabe unterschiedlicher Wachstumsstimulantien untersucht. Martin-Pérez et al. (54) stimulierten 3T3-Zellen mit folgenden Mitogenen: EGF (Epidermal Growth Factor), Prostaglandin F_2, Insulin und Serum. Die tryptischen Phosphopeptide von S6 trennten sie durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese. Die drei Phosphopeptidmuster, die aus mit EGF, Prostaglandin F_2 und Insulin stimulierten Zellen stammten, zeigen untereinander keine Unterschiede, vergleicht man aber die drei Phosphopeptidmuster mit dem, das aus mit Serum stimulierten Zellen gewonnen wurde, fällt auf, daß die sauren Phosphopeptide fehlen.
Wettenhall et al. (40) untersuchten die tryptischen Phosphopeptide von S6 aus Rattenleber nach Stimulation der Proteinsynthese mit Insulin und Glukagon. Nach Insulinbehandlung sind fünf Phosphopeptide stärker radioaktiv markiert, nach Glukagonbehandlung sind es zwei. Die isoelektrischen Punkte der Insulin spezifischen Phosphopeptide liegen zwischen 3,0 und 4,5.

Gabrielli et al. (53) isolierten aus Rattenleber eine durch Trypsin aktivierbare Proteinkinase, die in der lage ist, S6 aus Rattenleber in vitro an einer spezifischen Stelle zu phosphorylieren, die nicht durch die cAMP abhängige Proteinkinase präferentiell phosphoryliert wird. Auch aus Kaninchenretikulozyten und Mauslymphozyten konnte ein Trypsin aktivierbares Enzym isoliert werden, das S6 in vitro phosphoryliert (27, 55, 56, 57,).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei der S6 Phosphorylierung mehrere Proteinkinasen beteiligt sind, nur auf zwei Phosphorylierungsstellen werden durch die cAMP abhängige Proteinkinase Phosphatreste übertragen. Zusätzliche Proteinkinasen können mit den

in dieser Arbeit beschriebenen analytischen Methoden identifiziert werden. Ein Vergleich der tryptischen Phosphopeptidmuster mit dem in vivo phosphorylierten Phosphopeptidmuster, kann die präferentiell phosphorylierten Stellen der jeweiligen Proteinkinase anzeigen. Vorstellbar ist, daß ein Phosphorylierungsschritt die Voraussetzung für den folgenden ist.

Die Kontrolle der S6 Phosphorylierung ist ein komplexer biologischer Prozeß vergleichbar der Phosphorylierung der Glykogensynthetase (58). Die Glykogensynthetase besitzt am Caboxy-Ende sechs dicht beieinander liegende Phosphorylierungsstellen, die durch Hormone reguliert werden (39). Auch bei S6 liegen die Phosphorylierungsstellen, zumindest die, deren Aminosäuresequenz bekannt ist, dicht aneinander. Diese hohe Konzentration an negativen Ladungen könnte einen Einfluß auf RNA-Protein-Interaktionen haben. Die negativ geladenen Phosphatreste des S6 Proteins könnten mit den negativ geladenen Phosphatresten der RNA um positiv geladene Gruppen innerhalb der Ribosomen konkurrieren. Dieser Effekt könnte dazu führen, daß eine gewisse Region der 18S RNA freigegeben wird, die für die Bindung der mRNA an die 40S-Untereinheit wichtig ist; was wiederum zur Folge hat, daß viele aktive Polysomen gebildet werden.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Revel, M., Groner, Y., Annu. Rev. Biochem. 47, 1079 - 1126 (1978)

(2) Trachsel H., Erni, B., Schreier, H.M., Staehelin, T.J., Mol. Biol. 116, 755 - 767 (1977)

(3) Kozak, M., Cell 15, 1109 - 1123 (1978)

(4) Farrell, P.J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R.J., Trachsel, H., Cell 11, 187 - 200 (1977)

(5) Austin, S.A., Clemens, M.J., FEBS Lett. 110, 1 - 7 (1980)

(6) Martini, O.H.W., Kruppa, J., Eur. J. Biochem. 95, 349 - 358 (1979)

(7) Kruppa, J., Martini, O.H.W., Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 428 - 435 (1978)

(8) Bielka, H., Stahl, J., Int. Rev. Biochem. 18, 79 - 768 (1978)

(9) Wool, I.G., Annu. Rev. Biochem. 48, 719 - 754, (1979)

(10) Traugh, J.A., in Biochemical Actions of Hormones (Litwack, G., ed) 8, 167 - 208, Academic Press, New York (1981)

(11) McConkey, E.H., Bielka H., Gordon, J., Lastick, S.M., Lin, A., Ogata, K., Reboud, J.P., Traugh, J.A., Traut, R.R., Warner, J.R., Welfle, H., Wool, I.G., Mol. Gen. Genet. 169, 1 - 6 (1979)

(12) Leader, D.P. in Molecular Aspects of Cellular Regulation (Cohen, P. ed) 1, 203 - 234, Elsevier Biomedical, Amsterdam, New York, (1980)

(13) Lastick, S.M., McConkey, E.H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 917 - 923, (1980)

(14) Thomas, G., Martin-Pérez, J., Siegmann, M., Otto, A.M., Cell 30, 235 - 242, (1982)

(15) Nielsen, P.J., Manchester, K.L., Towbin, H.,

Gordon, J., Thomas, G., J. Biol. Chem. 257, 12 316 - 12 321 (1982)

(16) Kruppa, J., Darmer, D., Kalthoff, H., Richter, D., Eur. J. Biochem., 129, 537 - 542 (1983)

(17) Scharf, K.D., Nover, L., Cell 30, 427 - 437 (1982)

(18) Martini, O.H.W., Kruppa, J. Eur., J. Biochem. 95, 349 - 358 (1979)

(19) Kruppa, J., Clemens, M.J., EMBO J. 3, 95 - 100 (1984)

(20) Ballinger, D.G., Hunt, T., Dev. Biol., 87, 277 - 285 (1982)

(21) Nielsen, P.J., Thomas, G., Maller, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2937 - 2941 (1982)

(22) Duncan, R., McConkey, E.H., Eur. J. Biochem., 123, 539 - 544 (1982)

(23) Thomas, G., Martin-Pérez, J., Siegmann, M., Otto, A.M., Cell, 30, 235 - 242 (1982)

(24) Duncan, R., McConkey, E.H., Eur. J. Biochem., 123, 535 - 538 (1982)

(25) Nielsen, P.J., Duncan, R., McConkey, E.H., Eur. J. Biochem., 120, 523 - 527 (1981)

(26) Duncan, R., McConkey, E.H., Eur. J. Biochem., 123, 535 - 538 (1982)

(27) Del Grande, R.W., Traugh, J.A., Eur. J. Biochem. 123, 421 - 428 (1982)

(28) Wettenhall, E.H., Cohen, P., FEBS Lett. 140, 263 - 269 (1982)

(29) Thomas, G., Siegmann, M., Gordon, J., Jimenez de Asua, L., Martin-Pérez, J., Nielsen, P. in Conf. Cell Prolif. 8, Protein Phosphorylation (Rosen, O.M. and Krebs, E., G. eds) 783 - 799, Cold Spring Harbour Laboratories, New York (1981)

(30) Wettenhall, R.E.H., Howlett, G.J., J. Biol.

Chem. 254, 9317 - 9323 (1979)

(31) Lastick, S.M., McConkey, E.H., J. Biol. Chem. 256, 583 - 585 (1981)

(32) Freedman, S.D., Jamieson, J.D., J. Cell. Biol. 95, 903 - 908 (1982)

(33) Lastick, S.M., McConkey, E.H., J. Biol. Chem. 251, 2867 - 2875 (1976)

(34) Gressner, A.M., Wool, I.G., J. Biol. Chem. 249, 6917 - 6925 (1974)

(35) Nachtigall, R., Geisthardt, D., Behn, C., Kruppa, J., in Abstracts of European Journal of Cell Biology 2, (1983)

(36) De Tang, Q., Schatmann, R.C., Mazzei, G.J., Turner, R.S., Raynor, R.L., Liao, S., Kuo, J. F., Biochem. J. 213, 281 - 288 (1983)

(37) Gilman, A.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 305 - 312 (1970)

(38) Wettenhall, R.E.H., Morgan, F.J., J. Biol. Chem. 259, 2084 - 2091 (1984)

(39) Picton, C., Aitken, A., Bilham, T., Cohen, P., Eur. J. Biochem. 124, 37 - 45 (1982)

(40) Wettenhall, R.E.H., Cohen, P., Caudwell, B., Holland, R., FEBS Lett. 148, 207 - 213 (1982)

(41) Del Grande, R.W., Traugh, J.A., Eur. Biochem. 123, 421 - 428 (1982)

(42) Martin-Pérez, J., Thomas, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 926 - 930 (1983)

(43) Hunter, T., Sefton, B.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1311 - 1315 (1980)

(44) Martin, T.E., Cell 8ᴜ, 496 - 498 (1973)

(45) Hartree, E.F., Anal. Biochem. 48, 422 - 427 (1972)

(46) Laemmli, U.K., Nature 227, 680 - 685 (1970)

(47) Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G., Anal. Biochem. 36, 401 - 412 (1970)

(48) Studier, F.W., J. Mol. Biol. 79, 237 - 248 (1973)

(49) Traugh, J.A., Del Grande, R.W., Tuazon, P.T., in Cell Proliferation, 8, Protein Phosphorylation (Rosen, O.M., Krebs, E.G., eds) 999 - 1012 Cold Spring Harbour Laboratories, New York (1981)

(50) Kruppa, J., Habilitationsschrift, Hamburg 1980

(51) Howard, G.A., Traugh, J.A., Croser, E.A., Traut, R.R., J. Mol. Biol. 93, 391 - 404 (1975)

(52) Novak-Hofer, I., Thomas, G., J. Biol. Chem. 259, 5995 - 5600 (1984)

(53) Gabrielli, B., Wettenhall, R.E.H., Kemp, B.E., Quinn, M., Bizonova, L., FEBS Lett. 175, 219 - 226 (1984)

(54) Martin-Pérez, J., Siegmann, M., Thomas, G., Cell, 36, 287 - 294 (1984)

(55) Perisic, O., Traugh, J.A., J. Biol. Chem., 258, 9589 - 9592 (1983)

(56) Lubben, T.H., Traugh, J.A., J. Biol. Chem., 258, 13992 - 13997 (1983)

(57) Eckols, T.K., Thompson, R.E., Masanacchia, R. A., Eur. J. Biochem., 124, 249 - 254 (1983)

(58) Cohen, P., Antoniw, J.F., Nimmo, H.G., Yeaman, S.J., Ciba Foundation Symp., 41, 281 - 295 (1976)

Lebenslauf von

Rosemarie Nachtigall, geb. Heyde

25.5.1950	geboren in Stuttgart Eltern: Waldemar Heyde, Landgerichtsdirektor Gerda Heyde, geb. Nitzsche drei Brüder
April 1957	Einschulung in die Grundschule Leonberg
1961 - 70	Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Leonberg
Juni 1970	Abitur
1970 - 72	Besuch der Lehranstalt für Kranken-gymnastik in Berlin
1972 - 73	Berufspraktikum für Krankengymnastik am Klinikum Steglitz Berlin
1973 - 74	Berufsausübung als Krankengymnastin am Jüd. Krankenhaus Berlin
Okt. 1974	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin im Fachbereich Biologie
Jan. 1977	Diplomvorprüfung
Nov. 1978	Diplomhauptprüfung

1979	Anfertigung der Diplomarbeit "Zur radioaktiven Markierung von mRNA aus Langerhans'schen Inseln des Kaninchens" in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Abteilung Molekularbiologie, Berlin
1980 - 82	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie Universität Hamburg und Beginn der vorliegenden Dissertation
Juli 1980	Heirat mit Klaus Nachtigall, Dipl. Ing. Arch. Nav.
Nov. 1981	Geburt unseres Sohnes Jonny